

SHENG WU HUA XUE

生物化学

朱汝璠 张楚富 主编



武汉大学出版社

THE UNIVERSITY OF CHICAGO

PHYSICS DEPARTMENT



RECEIVED

生 物 化 学

朱汝璠 张楚富 主编

编写人员： 朱汝璠 张楚富
陈正望 高健婷



武汉大学出版社

中科院植物所图书馆



S0014712

25371

生物化学

朱汝璿 张楚富 主编

*

武汉大学出版社出版

(武昌 珞珈山)

新华书店湖北省发行所发行

武汉大学印刷厂印刷

*

787×1092毫米 1/16 43,625印张 1046千字

1989年12月第1版 1989年12月第1次印刷

印数: 1—2000

ISBN 7-307-00618-9/Q·18

定价: 7.50元

前 言

编写《生物化学》前曾经有过犹豫，因为生物化学发展很快，担心难以达到新的高度。但是，在教学实践中，学生们迫切希望我们根据多年来的教学体会，并结合生物化学的新成果编写出一本新的生物化学教科书。在这种情况下，我们决定还是作一次尝试。

我们在编写过程中注意到了以下两点：一、在内容的安排上由浅入深，尽可能做到叙述深入、细致，并联系学生的前行课程（如有机化学、生物学、物理化学等），侧重生物化学的基本原理和反应机制的介绍，便于学生阅读、理解和掌握。二、注意教材的系统性和前后章节之间、代谢途径之间的联系。

本书可作为综合性大学、师范院校生物系各专业、化学系有关专业的生物化学教材，亦可供农业、医药等院校本科生、研究生、教师以及有关科研人员参考。

本书的编写是在朱汝璠教授统一组织下进行的。参加本书初稿编写的有朱汝璠（第1、2、5、6、12、13、14、15章）、张楚富（第3、4、7、16章）、陈正望（第8、9章）、高健婷（第10、11章）。初稿的修改以及定稿工作是由朱汝璠和张楚富两同志完成的。

武汉大学生物系沈萍副教授审阅了“基因工程”一章，刘利东老师参加了有关章节的材料收集，陈宝联和熊定荣同志代绘了大部分插图。我们对上述同志的支持谨致谢意。

本书初稿完成后，承蒙北京师范大学吴国利教授审阅，并提出了许多宝贵意见。在此，我们表示衷心的感谢。

尽管我们作了很大的努力，但由于学识所限，必然会有难尽如意的地方，甚至还可能会有错误之处，恳请同行和读者批评指正。

编 者

一九八七年六月

目 录

第一章 糖类化合物 (1)

第一节 糖的定义和分类 (1)

一、单糖 (1)

二、低聚糖 (2)

三、多糖 (2)

第二节 单糖 (2)

一、单糖的结构 (2)

二、单糖的性质 (8)

三、单糖衍生物 (16)

第三节 低聚糖 (18)

一、二糖 (18)

二、三糖 (20)

第四节 多糖 (20)

一、同聚多糖 (20)

二、杂聚多糖 (23)

三、结合多糖 (25)

第二章 脂类 (29)

第一节 酰基甘油酯 (29)

一、构成酰基甘油酯的脂肪酸 (29)

二、三酰甘油酯的结构和类别 (23)

三、三酰甘油酯的理化性质 (33)

第二节 磷酸甘油酯类 (37)

一、磷酸甘油酯类的通式和命名 (37)

二、生物体中常见的几种甘油磷脂 (38)

三、甘油磷脂的性质 (41)

第三节 鞘磷脂类 (45)

第四节 糖脂类 (46)

一、甘油醇糖脂 (46)

二、鞘糖脂 (47)

三、糖脂的性质及功能 (49)

第五节 甾类化合物 (50)

一、类固醇骨架结构 (50)

二、类固醇化合物的结构特点 (51)

三、固醇类 (51)

第六节 前列腺素 (54)

第七节 脂蛋白 (56)

第八节 类脂和生物膜 (57)

一、生物膜的种类和组成 (57)

二、生物膜的结构 (59)

三、一个生物膜结构的实例——红细胞膜 (61)

四、生物膜的复杂功能 (61)

第三章 蛋白质 (63)

第一节 蛋白质概述 (63)

一、蛋白质是生物体内最重要的物质 (63)

二、蛋白质的元素组成 (63)

三、蛋白质的基本组成单位是氨基酸 (64)

四、蛋白质的分类 (64)

第二节 氨基酸 (64)

一、氨基酸的结构及其分类 (65)

二、氨基酸的构型和旋光性 (70)

三、紫外吸收特性 (72)

四、氨基酸的酸碱性质 (72)

五、氨基酸的化学反应 (78)

六、氨基酸的分离和分析 (84)

第三节 蛋白质的一级结构和一级结构测定 (88)

一、蛋白质结构导论 (88)

二、蛋白质分子的主链结构 (89)

三、天然出现的非蛋白质的肽类 (92)

四、蛋白质一级结构的测定 (93)

五、蛋白质一级结构测定的生物学意义 (102)

六、多肽和蛋白质的化学合成 (105)

第四节 蛋白质的空间构象 (109)

一、研究构象的方法.....(109)	五、DNA 分子组织结构的某些特点.....(187)
二、蛋白质的二级结构.....(110)	第五节 RNA 的结构.....(192)
三、蛋白质的三级结构.....(117)	一、RNA 的类型和一般结构特征.....(192)
四、蛋白质的四级结构.....(117)	二、RNA 的核苷酸顺序测定.....(193)
五、稳定蛋白质空间构象的作用力.....(118)	三、tRNA 的结构.....(196)
六、两类主要蛋白质的构象.....(120)	四、mRNA 的结构某些特征.....(201)
七、蛋白质的氨基酸顺序与空间构象的关系.....(126)	五、rRNA 的结构.....(203)
八、蛋白质空间构象与功能的关系.....(129)	第六节 核酸的性质.....(206)
第五节 蛋白质的性质及其分离纯化.....(135)	一、核酸的溶解性质.....(206)
一、蛋白质的两性解离性质.....(135)	二、核酸的带电性质.....(206)
二、蛋白质的胶体性质与蛋白质的沉淀分离.....(140)	三、核酸的旋光性.....(207)
三、蛋白质的沉降作用及超离心分离.....(142)	四、核酸的粘度.....(207)
四、蛋白质的凝胶过滤.....(144)	五、核酸分子的大小.....(207)
五、蛋白质的配体特异性与亲和层析.....(145)	六、核酸的紫外吸收特性.....(209)
六、蛋白质分子量的化学测定.....(146)	七、核酸的沉降特性和浮力密度.....(210)
第六节 糖蛋白和脂蛋白.....(147)	八、核酸的变性与复性.....(212)
一、糖蛋白.....(147)	第七节 核酸类物质的制备.....(216)
二、脂蛋白.....(150)	一、核苷酸类物质制备.....(216)
第四章 核酸.....(153)	二、核酸的分离纯化.....(220)
第一节 核酸概述.....(153)	第五章 维生素.....(224)
第二节 核酸的组成.....(154)	第一节 水溶性维生素.....(224)
一、核酸中的碱基.....(155)	一、硫胺素.....(224)
二、核苷.....(157)	二、核黄素.....(226)
三、核苷酸.....(159)	三、烟酸和烟酰胺.....(227)
四、碱基、核苷、核苷酸的性质.....(162)	四、维生素 B ₆(229)
第三节 核酸的共价结构.....(169)	五、泛酸.....(230)
一、磷酸二酯键.....(169)	六、生物素.....(231)
二、核酸共价结构的表示法.....(171)	七、维生素 B ₁₂ (钴胺素).....(233)
第四节 DNA 的结构.....(172)	八、叶酸.....(235)
一、DNA 分子的碱基组成特征.....(172)	九、维生素 C.....(237)
二、DNA 分子的双螺旋结构.....(173)	第二节 脂溶性维生素.....(238)
三、DNA 分子的超螺旋结构.....(177)	一、维生素 A 或类视黄醇.....(238)
四、DNA 的顺序分析.....(180)	二、维生素 D.....(239)
	三、维生素 E (α -生育酚).....(242)
	四、维生素 K.....(243)
	第六章 酶.....(246)
	第一节 引言.....(246)
	第二节 酶的分类、命名及其所催化的反应.....(247)

一、 酶的分类原则	(247)
二、 酶的命名原则	(247)
三、 各类酶催化的化学反应	(248)
第三节 酶的化学本质	(251)
一、 酶是有催化活性的蛋白质	(251)
二、 一些辅酶或辅基的结构、性质、功能	(251)
第四节 酶催化的特点	(255)
一、 酶是高效催化剂	(255)
二、 酶催化作用具有高度专一性	(257)
第五节 酶的活力测定	(260)
一、 酶反应速度的测定	(260)
二、 定量追踪酶反应的方法	(261)
三、 酶活力的表示方法	(262)
第六节 酶促反应的动力学	(263)
一、 底物浓度对酶促反应速度的影响	(263)
二、 pH 对酶促反应的影响	(268)
三、 温度对酶促反应的影响	(270)
四、 抑制剂对酶的抑制作用和其动力学	(271)
第七节 酶活性部位的本性和酶的作用机制	(277)
一、 α -胰凝乳蛋白酶	(277)
二、 核糖核酸酶	(281)
三、 溶菌酶	(284)
四、 羧肽酶A	(286)
五、 乳酸脱氢酶	(288)
第八节 具有起搏器和调节酶性质的酶系统	(291)
一、 别构酶	(292)
二、 级联系统共价修饰调节酶	(297)
第九节 酶的提取和分离纯化	(299)
一、 酶的提取	(299)
二、 粗提液中各种酶成分的分离	(300)
三、 酶的进一步纯化	(301)
四、 酶的结晶和浓缩	(302)
五、 酶的纯度鉴定及其指标	(302)
第十节 具有催化活性的多核苷酸	(303)
第七章 激素	(305)

第一节 激素概述	(305)
一、 激素的概念	(305)
二、 激素的功能	(305)
三、 激素的分类	(305)
四、 激素分泌的控制	(306)
五、 激素的一般特征	(307)
第二节 激素作用的原理	(308)
一、 蛋白质和肽激素以及肾上腺髓质激素的作用原理	(308)
二、 甾醇类激素的作用原理	(314)
第三节 蛋白质和多肽激素	(316)
一、 下丘脑激素	(316)
二、 垂体激素	(317)
三、 胰脏细胞分泌的激素	(323)
四、 调钙激素	(325)
第四节 氨基酸衍生物激素	(326)
一、 甲状腺激素	(326)
二、 肾上腺髓质激素	(327)
第五节 甾醇类激素	(330)
一、 肾上腺皮质激素	(330)
二、 性腺激素	(333)
第六节 前列腺素	(335)
第七节 植物激素	(336)
一、 植物生长素	(336)
二、 细胞分裂素	(337)
三、 赤霉素	(337)
四、 脱落酸	(337)
五、 乙烯	(338)
第八章 生物氧化和生物能量学	(339)
第一节 生物氧化的基本概况	(339)
一、 生物氧化的定义	(339)
二、 生物氧化的特点	(339)
三、 生物氧化的基本过程	(340)
第二节 生物氧化中的能量问题	(341)
一、 自由能的概念	(341)
二、 化学反应中自由能的变化	(342)
三、 氧化还原电势与自由能变化的关系	(347)
第三节 ATP 在能量转移中的作用	

用	(351)
一、生物体内的高能磷酸化合物	(351)
二、ATP 的特殊作用	(352)
第四节 电子传递与氧化磷酸化	(355)
一、线粒体内膜是发生氧化磷酸化的部位	(355)
二、电子传递链的组成和顺序	(356)
三、电子传递链的组织结构	(361)
四、氧化磷酸化	(362)
五、氧化磷酸化的偶联机制	(366)
第九章 糖代谢	(370)
第一节 糖酵解	(370)
一、糖酵解是糖分解代谢的一条主要途径	(370)
二、糖酵解的化学反应	(371)
三、在无氧条件下丙酮酸的去向	(380)
四、其他糖类的分解代谢	(382)
五、2,3-二磷酸甘油酸代谢	(382)
六、糖酵解的调节	(383)
第二节 三羧酸循环	(386)
一、丙酮酸氧化脱羧生成乙酰 CoA	(387)
二、三羧酸循环	(390)
三、三羧酸循环的控制	(397)
四、三羧酸循环的生物学意义	(398)
五、三羧酸循环中间物的回补	(402)
第三节 磷酸己糖支路	(405)
一、磷酸己糖支路的基本过程	(405)
二、磷酸己糖支路运转程度及调节	(409)
三、磷酸己糖支路的生物学意义	(409)
第四节 糖异生作用和糖元合成	(410)
一、葡萄糖的异生作用	(410)
二、糖元合成	(415)
第五节 光合作用	(417)
一、引言	(417)
二、光吸收色素	(419)
三、光反应	(420)
四、暗反应	(424)

五、光呼吸	(429)
第十章 脂类代谢	(431)
第一节 脂类化合物的吸收和转运	(431)
一、影响脂类吸收的因素	(431)
二、血浆脂蛋白与脂的运输	(432)
第二节 甘油三酯的分解代谢	(432)
一、甘油的分解代谢	(432)
二、脂肪酸的分解代谢	(432)
第三节 甘油三酯的合成代谢	(444)
一、脂肪酸的从头合成	(444)
二、脂肪酸的碳链延伸	(451)
三、不饱和脂肪酸的合成及脂肪酸间的互变	(452)
四、甘油三酯的合成	(454)
第四节 甘油磷脂的分解代谢	(458)
第五节 甘油磷脂的合成	(459)
一、磷脂酸的合成	(460)
二、磷脂酰乙醇胺的合成	(460)
三、磷脂酰胆碱的合成	(462)
四、磷脂酰丝氨酸的合成	(463)
五、磷脂酰肌醇和磷脂酰甘油的合成	(465)
六、缩醛磷脂的合成	(467)
第六节 鞘磷脂和其它鞘脂类的合成	(469)
一、鞘磷脂的生物合成	(469)
二、其它鞘脂类的合成	(471)
第七节 固醇代谢	(472)
一、胆固醇的生物合成	(472)
二、胆固醇的分解代谢	(477)
第八节 脂代谢失常引起的常见病	(480)
一、脂肪肝	(480)
二、高胆固醇血症	(480)
三、其它类型的疾病	(480)
第十一章 氨基酸代谢	(481)
第一节 合成氨基酸的氮源	(481)
一、生物固氮作用	(481)
二、由硝酸盐、亚硝酸盐还原成 NH_4^+	(481)

.....	(483)
三、由体内有机含氮化合物分解而得	
..... NH_3	(484)
第二节 氨基酸生物合成的碳源.....	(484)
一、糖酵解及三羧酸循环中所产生的	
..... 各种酮羧.....	(484)
二、合成亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸	
..... 的三种酮羧.....	(484)
三、合成丝氨酸的直接碳源.....	(487)
四、合成苯丙氨酸和酪氨酸的碳源	
..... 苯丙酮酸和对羟基苯丙酮酸	
..... 的合成.....	(487)
第三节 氨基酸的生物合成方式和	
..... 途径.....	(491)
一、酮羧的加氢作用.....	(491)
二、谷氨酸加 NH_3 合成谷氨酰胺.....	(492)
三、转氨作用合成氨基酸.....	(493)
第四节 氨基酸之间的转变.....	(495)
一、由门冬氨酸转变成其它氨基酸.....	(495)
二、由谷氨酸合成其它氨基酸.....	(502)
三、组氨酸的生物合成.....	(506)
四、色氨酸的生物合成.....	(508)
第五节 蛋白质的吸收和水解.....	(510)
第六节 氨基酸的脱氨反应.....	(511)
一、氨基酸的脱氨基作用.....	(511)
二、氨基酸的脱酰胺基作用.....	(515)
第七节 氨基酸脱氨产物的代谢去	
..... 路.....	(516)
一、氨的去路.....	(516)
二、酮羧的代谢去路.....	(521)
第八节 氨基酸的脱羧反应及其产	
..... 物的代谢去路.....	(530)
第十二章 核苷酸代谢	(533)
第一节 核苷酸的生物合成.....	(533)
一、嘌呤核苷酸的从头合成.....	(533)
二、嘌呤核苷酸的回收利用途径.....	(539)
三、嘌呤核苷酸合成的调节.....	(541)

四、嘧啶核苷酸的从头合成.....	(541)
五、嘧啶核苷酸的回收利用途径.....	(545)
六、嘧啶核苷酸合成的调节.....	(546)
七、脱氧核苷酸的生物合成.....	(546)
八、核苷酸辅酶的生物合成.....	(548)
第二节 核苷酸的分解代谢.....	(551)
一、嘌呤核苷酸的分解代谢.....	(552)
二、嘧啶核苷酸的分解代谢.....	(555)
第十三章 核酸的生物合成	(558)
第一节 DNA 的复制.....	(558)
一、半保留复制.....	(558)
二、DNA 的复制机制.....	(560)
三、与 DNA 合成有关的酶类.....	(563)
四、DNA 的复制过程.....	(571)
五、DNA 合成模式实例.....	(576)
第二节 DNA 的损伤和修复.....	(581)
一、引起 DNA 损伤的途径.....	(581)
二、DNA 损伤的修复.....	(583)
第三节 DNA 重组.....	(585)
一、一般重组.....	(585)
二、部分专一性重组.....	(586)
第四节 RNA 的生物合成.....	(587)
一、细菌 RNA 聚合酶作用模式和结	
..... 构.....	(587)
二、依赖于 DNA 的真核 RNA 聚合	
..... 酶.....	(591)
第五节 RNA 的转录及转录后加	
..... 工.....	(592)
一、tRNA 的转录及其后加工.....	(592)
二、rRNA 的转录及其后加工.....	(595)
三、mRNA 的合成和后加工.....	(598)
第十四章 蛋白质的生物合成	(605)
第一节 引言.....	(605)
第二节 遗传密码.....	(605)
一、遗传密码及其确定.....	(605)
二、遗传密码的简并性.....	(610)
三、遗传密码的通用性及其变异.....	(613)
第三节 核糖体及其在蛋白质合成中	
..... 的作用.....	(613)
一、rRNA 在蛋白质合成中的作用	

..... (615)	调控..... (657)
二、核糖体蛋白在蛋白质合成中的作用..... (617)	一、在噬菌体中原核 <i>m</i> RNA 翻译的调控..... (657)
第四节 蛋白质生物合成的过程及机制..... (618)	二、翻译产物在细胞内定位的控制..... (658)
一、氨基酸的活化——氨酰- <i>t</i> RNA 的合成..... (618)	三、 <i>m</i> RNA 寿命的调控..... (659)
二、肽链的起始..... (622)	四、翻译的定量控制..... (660)
三、肽链的延伸步骤及机制..... (626)	五、翻译的定性调控..... (661)
四、肽链合成的终止及肽的释放..... (628)	第十六章 基因工程——重组 DNA 技术..... (663)
五、通过多核糖体形式加速 <i>m</i> RNA 的翻译..... (631)	第一节 外源基因的分离..... (664)
第五节 蛋白质生物合成的后加工..... (634)	一、c DNA 法..... (664)
一、蛋白质的后加工方式..... (634)	二、限制性内切酶法..... (665)
二、蛋白质翻译后的后加工实例..... (636)	三、基因的化学合成..... (665)
第十五章 核酸和蛋白质合成的调控..... (638)	第二节 载体..... (665)
第一节 转录的调控..... (638)	一、质粒..... (666)
一、RNA 链的起始及其调节..... (638)	二、病毒 DNA..... (667)
二、RNA 链转录终止的调节..... (646)	第三节 体外重组..... (670)
三、通过对 RNA—聚合酶的修饰进行转录调节..... (647)	一、粘性末端互补法..... (671)
四、多基因的转录调控..... (648)	二、 <i>d</i> A- <i>d</i> T 法..... (671)
五、基因序列重排的调控..... (650)	三、平齐末端连接法..... (672)
六、在真核细胞中的转录与后加工的调控..... (654)	第四节 转化和筛选..... (672)
第二节 转录和翻译的协同调控..... (656)	一、受体细菌..... (673)
第三节 基因表达在翻译水平上的	二、转化..... (673)
	三、筛选..... (673)
	第五节 基因工程的应用..... (675)
	一、基因文库..... (675)
	二、基因工程的实际应用..... (676)
	附录..... (678)

第一章 糖类化合物

第一节 糖的定义和分类

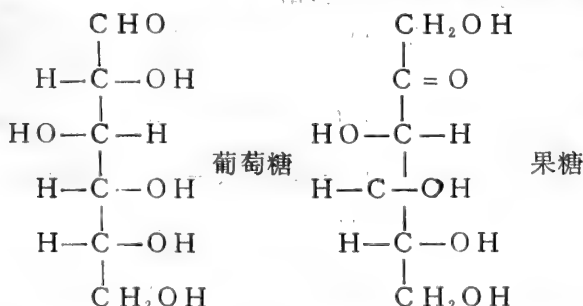
自然界到处都有糖，人类的衣食住行那一项也离不开糖，这并非言过其实。人们每天吃的饭和面制品里含有 70—80% 的淀粉；穿的棉麻衣衫由纤维素构成。淀粉、纤维素都是糖类化合物。总之，糖类化合物广布于植物界，种类繁多，禾谷类种子、薯类、含有丰富的淀粉；树木和作物秸秆含有大量纤维素；甘蔗、甜菜含有蔗糖；发芽种子中含有麦芽糖；水果中含有葡萄糖、果糖、果胶质等。动物中也含有一定量的糖，如血液中含有一定水平的葡萄糖，肝脏中含有肝糖元等作为贮藏多糖，乳汁中含有乳糖，此外昆虫血液中还含有海藻糖，每个生物细胞都含有核糖。

糖类主要由植物通过光合作用合成，它是人和动物生命活动所需能量的来源，植物所需能源也有赖于自己制造的糖来供给。

大部分糖类化合物是由碳、氢、氧三种元素构成的，最早人们发现糖中氢和氧之比为二比一，这和水分子的氢氧比相同，因此称糖类化合物为碳水化合物 (Carbohydrate)，以 $C_n(H_2O)_n$ 通式来表示。随着人们认识的不断加深，糖所包括的范围不断扩大，其成分也各不相同。如鼠李糖和各种脱氧糖的氢氧之比不是 2:1；各种多糖、胞壁糖等除含碳、氢、氧外还有氮和硫等元素。因此把碳水化合物改称为糖。1952 年我国根据许多糖都有甜味这一特性，把糖这个名称统一改为糖以代表这类化合物。凡是多羟醛、多羟酮，它们的环状半缩醛及其缩合物和某些衍生物统称糖类化合物 (Saccharide)。按照这一定义，糖可分为下列各类。

一、单糖 (monosaccharide)

单糖大多是多羟醛和多羟酮类化合物。如下式是葡萄糖和果糖的结构式，从式中可以看出它们都是多元醇的衍生物，含醛基或酮基，分子中的某羟基可和其本身的醛基或酮基起亲



核加成反应而成为环状半缩醛结构。多羟醛、多羟酮及其环状半缩醛都是糖类化合物的最简单形式，它们不能进一步水解成更简单的化合物，统称为单糖。

二、低聚糖 (Oligo—saccharide)

2—10个环状半缩醛型单糖相互缩合而成的-缩醛型化合物称为低聚糖。如蔗糖、麦芽糖、棉子糖等。

三、多糖 (Poly—saccharide)

由许多环状半缩醛型单糖缩合而形成的高分子缩醛化合物统称多糖或多聚糖(glycan)。如构成多糖分子的单糖完全相同,则称为同聚多糖(Homoglycan);如多糖分子由不同单糖分子缩合而成,则称为杂聚多糖(Heteroglycan)。前者如淀粉、纤维素、几丁质等,后者如肝素、软骨素和一些抗原性杂多糖等。

第二节 单 糖

一、单糖的结构

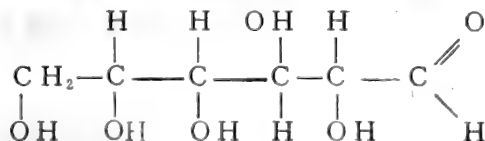
(一) 单糖的链状结构和构型 (Configuration)

以葡萄糖为例进行讨论。

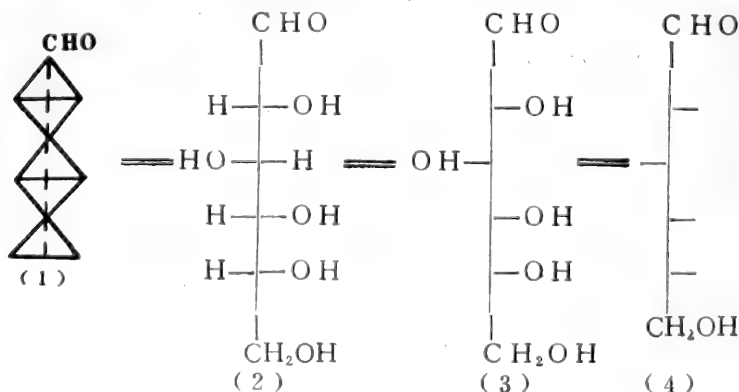
经元素分析知纯净葡萄糖的组成为 $C:H:O = 1:2:1$ 。经测定知其分子量为 180 dt,从而得出其分子式为 $C_6H_{12}O_6$ 。

葡萄糖具有下列性质:

- (1) 能与弱氧化剂——斐林氏试剂反应生成红色 Cu_2O 沉淀,说明其分子中有醛基。
- (2) 能与乙酸酐反应产生含五个乙酰基的衍生物,说明其分子中含有五个羟基。
- (3) 用 $Na-Hg$ 齐还原生成含六个醇羟基的直链六元醇——山梨醇,说明葡萄糖六个碳原子形成一条直链,从而得出其结构式为:



从所示结构式可以看出葡萄糖分子中的 2、3、4、5 碳原子为手性碳原子(不对称碳原子)。其立体构型可用以下几种方式表示。其中



都用横线和直线交点代表手性 碳原子，第(3)式省去 H— 原子，第 4 式用横线代表—OH 基。

由于葡萄糖有四个手性碳原子，所以应具有 $2^4 = 16$ 种旋光异构体，如表1—1。从 表中可以

表1—1 己醛糖各异构体的构型式

CHO	CHO	CHO	CHO	CHO	CHO	CHO	CHO
—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—
CH ₂ OH	CH ₂ OH	CH ₂ OH	CH ₂ OH	CH ₂ OH	CH ₂ OH	CH ₂ OH	CH ₂ OH
D(+)-阿洛糖	D(+)-阿卓糖	D(+)-葡萄糖	D(+)-甘露糖	D(-)-艾杜糖	D(-)-古洛糖	D(+)-半乳糖	D(+)-塔罗糖
CHO	CHO	CHO	CHO	CHO	CHO	CHO	CHO
—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—
CH ₂ OH	CH ₂ OH	CH ₂ OH	CH ₂ OH	CH ₂ OH	CH ₂ OH	CH ₂ OH	CH ₂ OH
L(-)-阿洛糖	L(-)-阿卓糖	L(-)-葡萄糖	L(-)-甘露糖	L(+)-艾杜糖	L(+)-古洛糖	L(-)-半乳糖	L(-)-塔罗糖

看出：D(+)- 葡萄糖是己醛糖十六种立体构型中的一种，这 就是动物血液、水 果中所含的葡萄糖。这16种异 构体中有八种称为 D— 型糖， 与伯醇基相邻的手性碳原子上的 —OH 基在右边。另八种则相反，—OH 基在左边，称为 L—型糖。所以 D 和 L 是指伯醇基相邻的碳原子上 —OH 的排布方向，—OH 基在右边的为 D—构 型，反之则为 L—构型。所有 醛糖如丙醛糖、丁醛糖、戊醛糖等都有 D—型和 L—型之分，它们都有 共同的结 构部分，如下式。

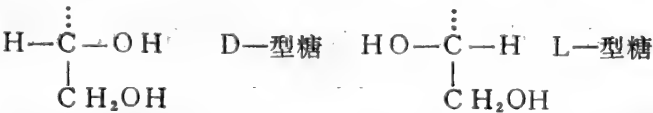
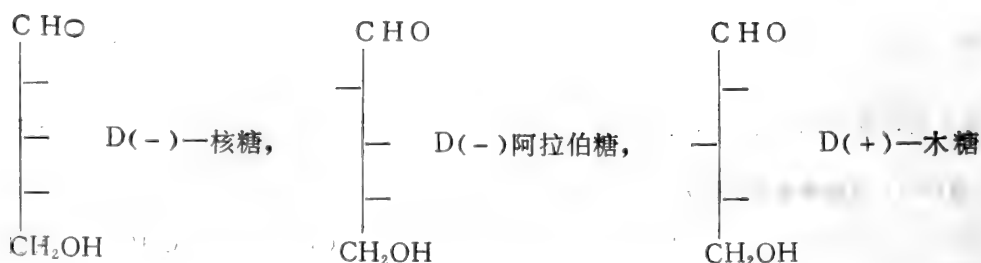
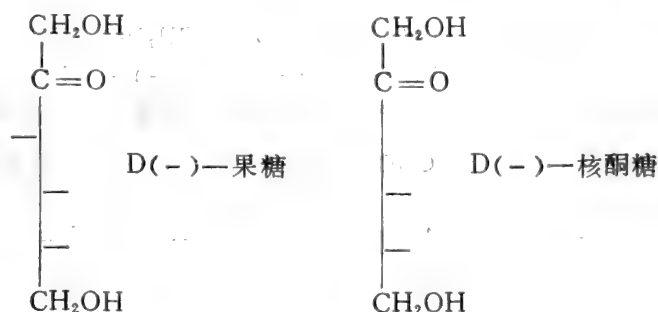


表1—1中八种 D—型糖和八种 L—型 糖互为对映体， 如 D(+)-葡萄糖和 L(-)-葡 萄糖互为对映体， 其它同此。表1—1中的(+)和(-)代表一种糖实际的比旋度是向右还是向 左，前者为(+)，后者为(-)。除了己醛糖外，自然界亦广泛存在许多戊醛糖如：



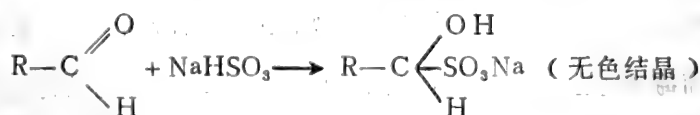
核糖是生物体核酸的主要成分，后二者存在于多糖——半纤维素中。此外还有丙醛糖、丁醛糖、庚醛糖等它们常以磷酸酯状态作为植物光合作用的中间产物或糖分解代谢的中间产物存在。自然界的糖大多为 D-型糖，L-型糖较少。

自然界的酮糖，最重要的有 D(-)-果糖和 D(-)-核酮糖，前者是己酮糖八种异构体中的一种。

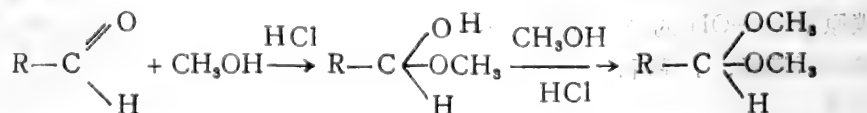


(二)单糖的环状结构

仍以 D-葡萄糖为例进行讨论。该糖链状结构已如上述。如果链状结构是该糖的唯一正确结构，则该糖应具有醛和醇的一切性质，如能与 Schiff's 试剂反应呈红色，能与 NaHSO_3 反应；



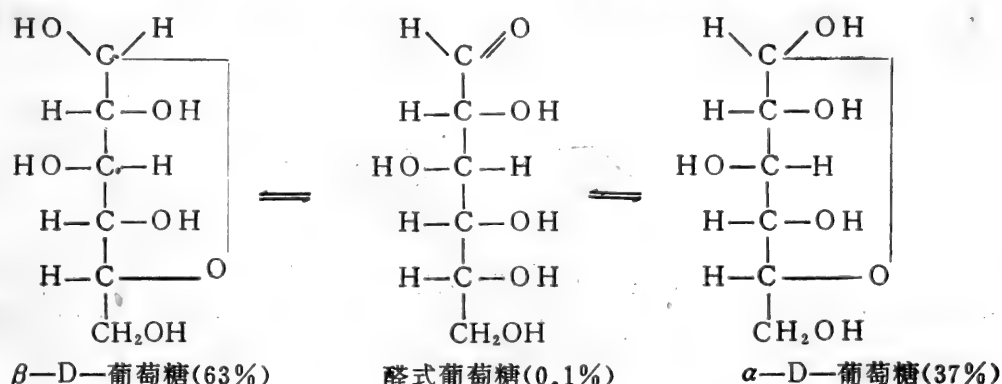
能与两分子甲醇反应。



但葡萄糖不能与 NaHSO_3 起加成反应，也不能与 schiff's 试剂反应，在 HCl 催化下只能与一分子甲醇作用生成缩醛型甲基葡萄糖，且甲基葡萄糖有两种，其旋光性不同。因此仅以上述链状结构式来代表葡萄糖结构是与实验事实相矛盾的。

另外葡萄糖溶液有变旋现象，在不同条件下所得的葡萄糖结晶，在配制的葡萄糖溶液中其比旋度有些为 112° ，而有些则为 18.9° ，而且这些比旋度随配制时间延长， 112° 者逐渐下降。 18.9° 者逐渐上升，当二者达 52.7° 时即不再变化。D-葡萄糖的这种变旋现象也充分说明用上述一种链状结构式来代表葡萄糖是不妥当的。

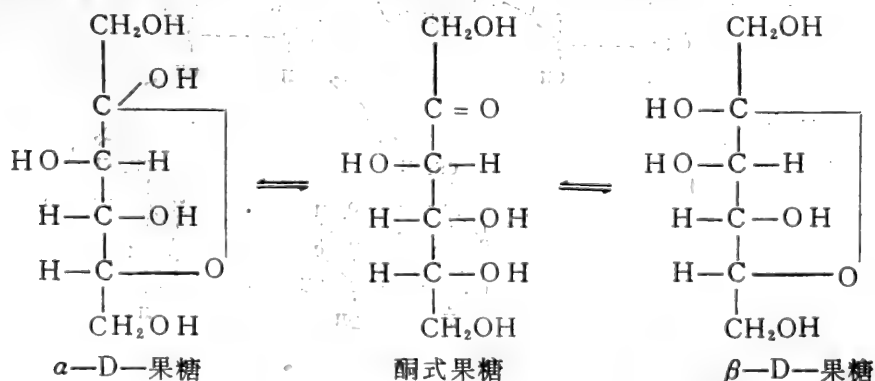
基于以上一些事实，人们推测 D-葡萄糖分子里的醛基可能与其本身的某醇羟基形成了环状半缩醛。醛基与第五个碳原子上的醇羟基作用，则可形成两种环状半缩醛。如下式：



从上式看出：醛基碳原子不是手性碳原子，而当 D-葡萄糖形成半缩醛后，该碳原子变成了手性碳原子，因而环状半缩醛式的葡萄糖应有两种，一种其半缩醛羟与决定其 D-构型的羟基分布在同边，称为 α -D-葡萄糖；另一种其半缩醛羟与上面一种相反，称为 β -D-葡萄糖。 α -D-葡萄糖的比旋度为 112° ，而 β -D-葡萄糖的比旋度则为 18.9° ，这两种糖在水溶液中可通过醛式糖而互变，最后成为一平衡混合物，其比旋度为 52.7° 。达平衡后， β -型糖占 63%， α -型糖占 37%，而醛式则很少。葡萄糖的变旋现象从而得到圆满解释。由于平衡混合物中链式糖含量极少，故这完全可以解释为什么葡萄糖只具有醛的一些性质，而不具有醛类化合物的所有性质。

上述 α 和 β -D-葡萄糖是第五个碳原子上的醇羟基和醛基加成反应而生成的六环半缩醛，常称为 α -D-吡喃葡萄糖 (α -D-glucopyranose) 和 β -D-吡喃葡萄糖。第四个碳原子上的羟基也可和醛基加成而生成五环葡萄糖 (Glucofuranose)。五环和六环都是无张力环，对葡萄糖来说六环比五环更稳定。

酮糖的羰基，由于受相邻两碳原子上醇羟基的影响变得更活泼，类似于醛基，亦可与分子内部的醇羟基起加成反应而形成类似环状半缩醛的结构。如果糖在水溶液中可用下式表示。

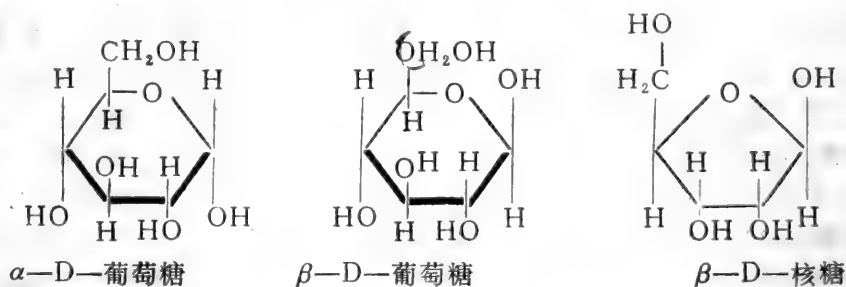


上述单糖的环状结构式由 Fischer 提出，称为 Fischer's 式，它能解释糖的一些性质，

而且能表示出各手性碳原子上各基团的排布方向，但还不能准确地反映单糖分子的立体构型。Harworth 提出了透式。式子的书写原则首先是画一个六边形或五边形，并将其一角写上氧以表示六环或五环糖，把环上一些线画粗一些，以显立体感。除氧以外其它角代表碳原子，从氧开始按顺时针方向将碳原子编号如下式：



环画好后，把 Fischer's 式左边的各基团按六环1—4、五环1—3 的号码写在平面上方，而右边各基团则写在平面下方，但六环第5位碳原子和五环第4位碳原子上基团的方向则正好以相反方向排布。



在写 Harworth 式时，环中最后一个碳原子上的基团方向之所以要反过来，是因为醇羟基与醛基反应成环时必须将羟基所连碳原子的键旋转 $109^{\circ}28'$ ，使羟基转到醛基近旁，便于羟基对羰基碳的亲核进攻反应。兹以葡萄糖为例示如下图1—1。

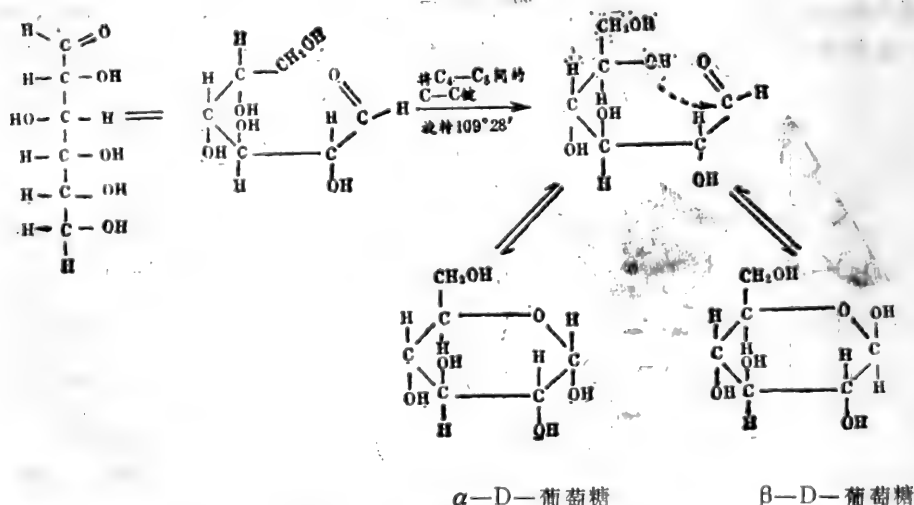
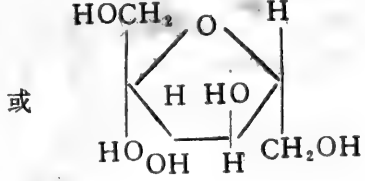
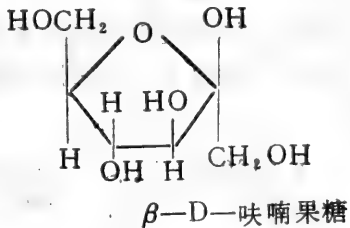
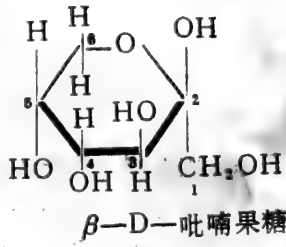
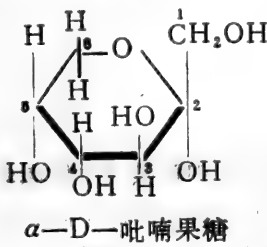


图1—1 D-葡萄糖的环化过程

从图1-1可见，D-型糖成环后，环外含碳基团位于环平面上方，而 L-型糖则相反位于环平面下方。

酮糖环状结构式写法与醛糖相似，只是从氧开始按顺时针方向将碳原子编号时，紧邻氧的碳原子不是编为1，如 D-果糖即编为2，C-1 则在环外。果糖的各 Harworth 式如下：



在书写 Harworth 式时，有时亦可从 氧开始按反时针方向将碳原子编号，这样，每个碳原子上基团的方向与顺时针编号时相反，如上式中的 β -D-呋喃果糖的两种写法就是一个例子。

(三)单糖的构象

上面用 Harworth 式所表示的糖的结构式，糖环上所有原子都位于同一平面内。事实上糖环和环己烷等一样，环内各原子并不位于同一平面上，六环糖也有椅式和船式两种构象，但椅式更为稳定。这是由于在椅式构象中连结相邻碳原子间的扭角 ϕ 约为 60° ，而船式构象中其扭角 ϕ 实际上约等于零，因此在前者中各碳原子上取代基之间的斥力比后者小，

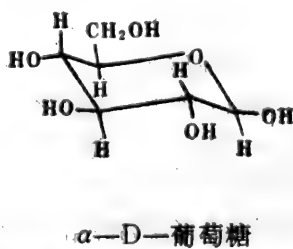
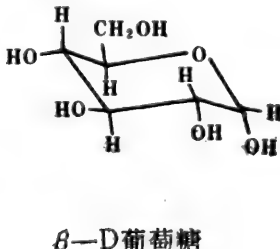


图1-2 D-葡萄糖的两种构象式

据测量约小几千卡。所以椅式比船式能量低而较稳定。再则船头船尾的取代基相距甚近(约 18.4 Å), 有较强的范德华力, 这也是一个不稳定因素。己醛糖中的 α 和 β -D-葡萄糖的的构象式如图 1-2。从这两种式子可以看出: β -D-葡萄糖 C-1 上的羟基位于赤道键位置, 而 α -D-葡萄糖则处于轴向键位置, 所以 β -D-葡萄糖比 α -D-葡萄糖稳定, 在它们的平衡混合物中 β -D-葡萄糖占优势。把葡萄糖与甘露糖和半乳糖相比较, 葡萄糖的赤道键上的羟基比其它糖多, 因而比其它糖稳定。自然界中 D-葡萄糖之所以占优势, 可能与其特别稳定的构象有关。

二、单糖的性质

(一)单糖的物理性质

单糖含有许多羟基, 因而都有较大的水溶性。其分子中都具有手性碳原子, 所以都具有旋光性。每一种单糖, 由于分子中碳原子上基团在空间的排布方向不同, 所以各有其特定的比旋值, 彼此互异。用旋光法测定各种单糖溶液的旋光度, 根据各糖的比旋值即可获得该糖溶液的浓度, 其计算公式如下: 式中 $[\alpha]_D^{20}$ 为 20℃ 在钠光下糖的比旋值(可通过查找手册获得), a 为旋光仪实际测得某糖溶液的旋光度, L 为旋光管长(dm), C 为糖溶液的浓度(g/100ml)。表1—2是常见单糖的比旋值(是指在水溶液中平衡混合物的比旋值)

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{a \times 100}{LC} \quad \therefore C = \frac{a \times 100}{[\alpha]_D^{20} \times L}$$

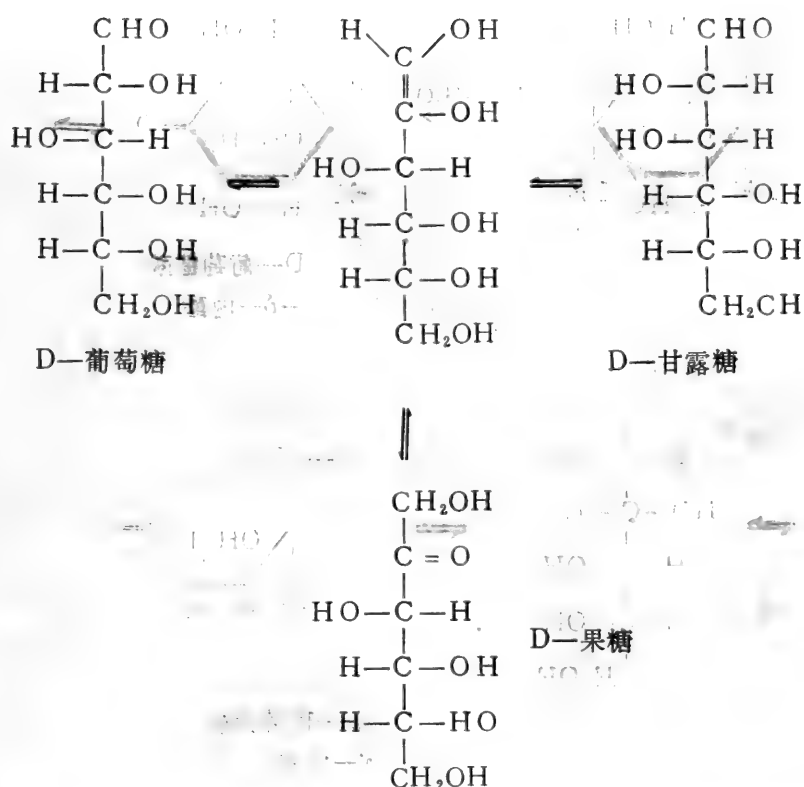
表1—2 各种单糖的比旋值

糖	α -型	平衡混合物	β -型
D(+)-葡萄糖	+112°	+52.7°	+18.9°
D(+)-半乳糖	+150.7°	+80.2°	+52.8°
D(+)-甘露糖	+29.3	+14.5°	-16.3°
D(-)-果糖		-92°	133.5°
D(+)-核糖		+23.1° - 23.7	

(二)单糖的化学性质

1. 单糖在稀碱溶液中的烯醇化作用及异构化作用

在单糖分子中, 由于醛或酮羰基的诱导效应, 使其 α -氢微带酸性, 其 PK_a 值在葡萄糖中为 6.6×10^{-13} , 在甘露糖中为 10.9×10^{-13} , 在果糖中为 9.0×10^{-13} 。所以在稀碱溶液中这些醛糖和酮糖可以形成烯醇结构, 而且可通过烯醇式结构而达到相互转变。下面是三种糖在稀碱溶液中通过烯醇式而互变的反应式。



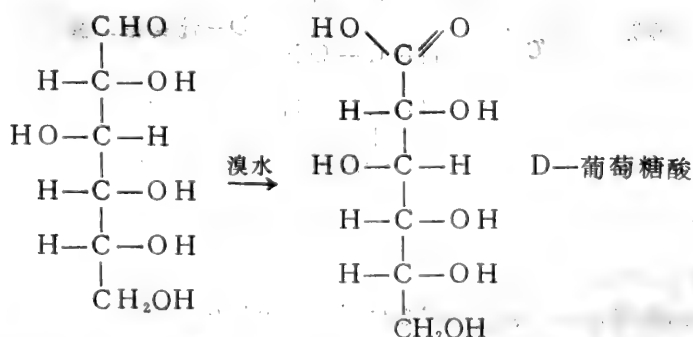
在生物体内一些糖的磷酸酯是通过一些异构酶或差向异构酶的催化经烯醇式中间物而互相转变的。

2. 单糖的氧化作用

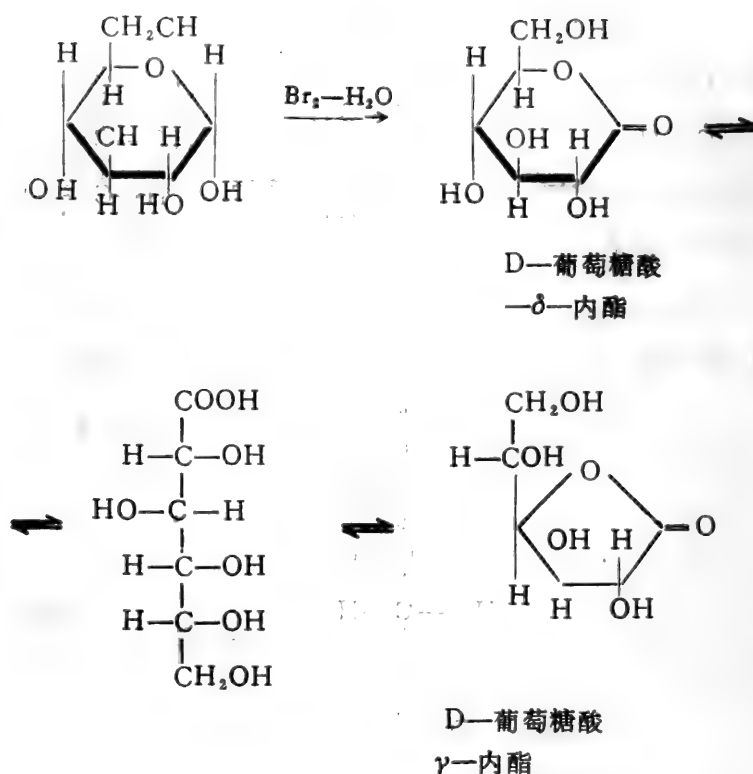
在不同氧化剂作用下，单糖会生成不同的氧化产物。亦以葡萄糖为例进行讨论。

(1) 与溴水作用

溴水是酸性氧化剂，它可使醛糖的醛基氧化成羧基，形成相应的糖酸 (adonic acid)。如 D-葡萄糖可被溴水氧化成 D-葡萄糖酸 (D-gluconic acid)。

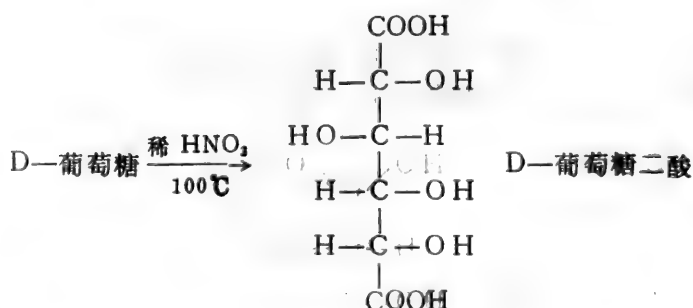


但由于在水溶液中单糖主要以环状半缩醛状态存在，因而实际反应为：



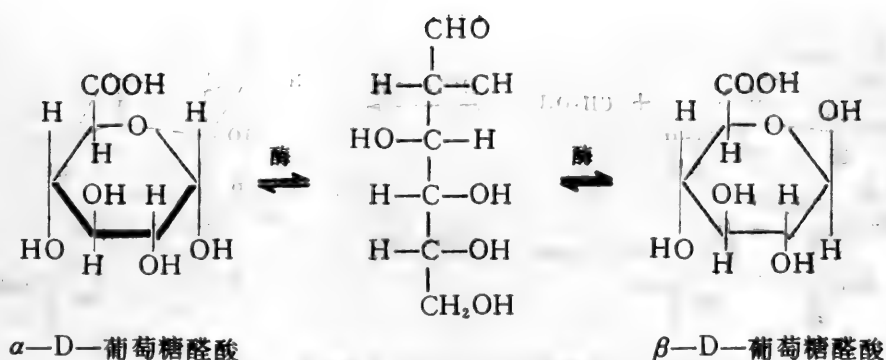
(2) 与稀硝酸作用

稀硝酸氧化能力比溴水强，它不仅能使醛基氧化成羧基，也能使醛基远端的伯醇基氧化成羧基。如葡萄糖在稀硝酸中氧化成葡萄糖二酸。糖二酸亦易生成内酯。



(3) 单糖伯醇基的氧化

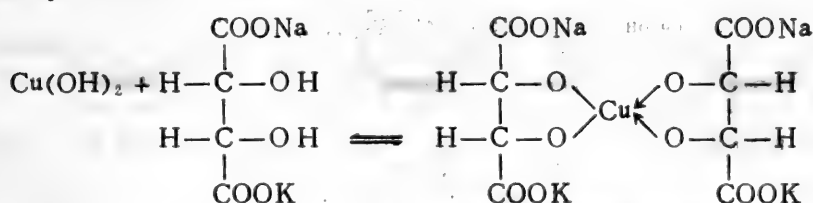
当环状糖的半缩醛羟基被保护而形成缩醛时，再用氧化剂氧化，则只有伯醇基被氧化成羧基，而醛基未被氧化。将氧化产物水解即成糖醛酸。在生物体内，在专一性酶催化下可生成糖醛酸。如：



在人体的肝腔中存在葡萄糖醛酸，它能与酚、醇等有毒物质形成缩醛，使有毒成分变为可溶性无毒物质，排出体外而解毒。因此临床上常用糖醛酸治疗肝炎、肝硬化及一些药物中毒疾病。

(4) 单糖在碱性溶液中的氧化作用

氧化单糖常用的碱性氧化剂有 Fehling's 试剂和 Benedict's 试剂，前者是由 CuSO_4 和 NaOH + 酒石酸钾钠两种试剂临用前混合而成，其主要成分为 CuSO_4 和 NaOH ，酒石酸钾钠的作用是络合 Cu^{++} 使之处于可溶状态而进行对糖的氧化。



酒石酸钾钠铜络合物

Benedict's 试剂与 Fehling's 试剂相似，只是以 Na_2CO_3 代替 NaOH ，以柠檬酸代替酒石酸钾钠以络合 Cu^{++} 。这两种试剂在糖的定性和定量分析上是常用试剂。氧化产物有糖酸，但由于在碱性溶液中，糖首先生成烯二醇化合物，所以氧化产物极为复杂，曾有人分离出四十余种产物，而且条件不同反应产物不同。因此将此法用于糖的定量分析时，一定要同时做标准样品对照，否则会带来较大误差。在反应中 Cu(OH)_2 被糖还原成 Cu_2O 红色沉淀，单糖由于具有这一性质而称为还原糖。

3. 单糖的成苷反应以及糖苷的性质

环状单糖具有半缩醛羟基，在适当条件下可与醇脱水生成缩醛，这些缩醛又称糖苷 (Glycoside)。单糖有 α 和 β 两种类型，所以单糖苷也有 α 、 β 两种类型。D-葡萄糖与甲醇反应生成的两种糖苷的反应如图1—3所示。

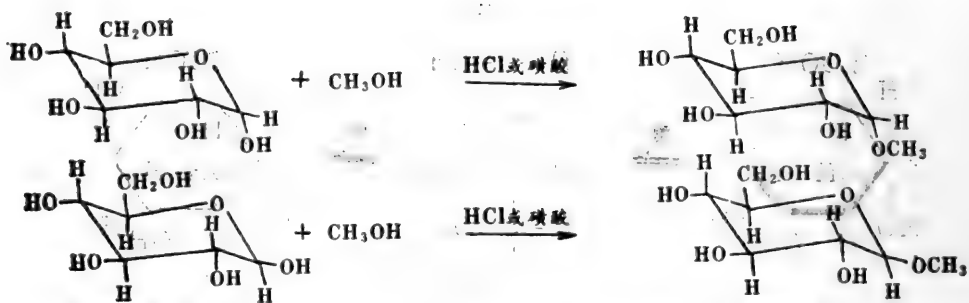


图1—3 D—葡萄糖与甲醇反应生成两种糖苷的反应式

糖苷性质与糖完全不同，因糖苷为缩醛化合物，故已不存在半缩羟基， α 和 β —糖苷不能互变，不再具有醛的性质，也不会具有变旋现象。但糖苷具有缩醛的性质，能在酸或酶的催化下水解成为相应的糖和醇。图1—4是 β —D—葡萄糖苷和 α —D—果糖苷水解成糖和醇的反应式。

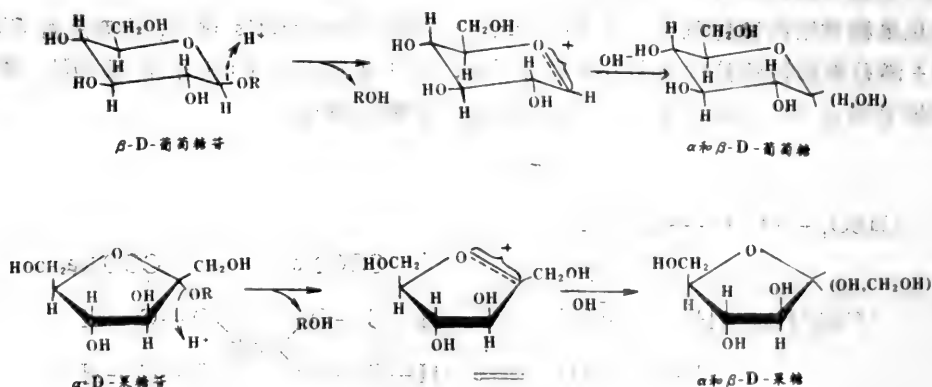


图1—4 糖苷在酸作用下水解的反应式

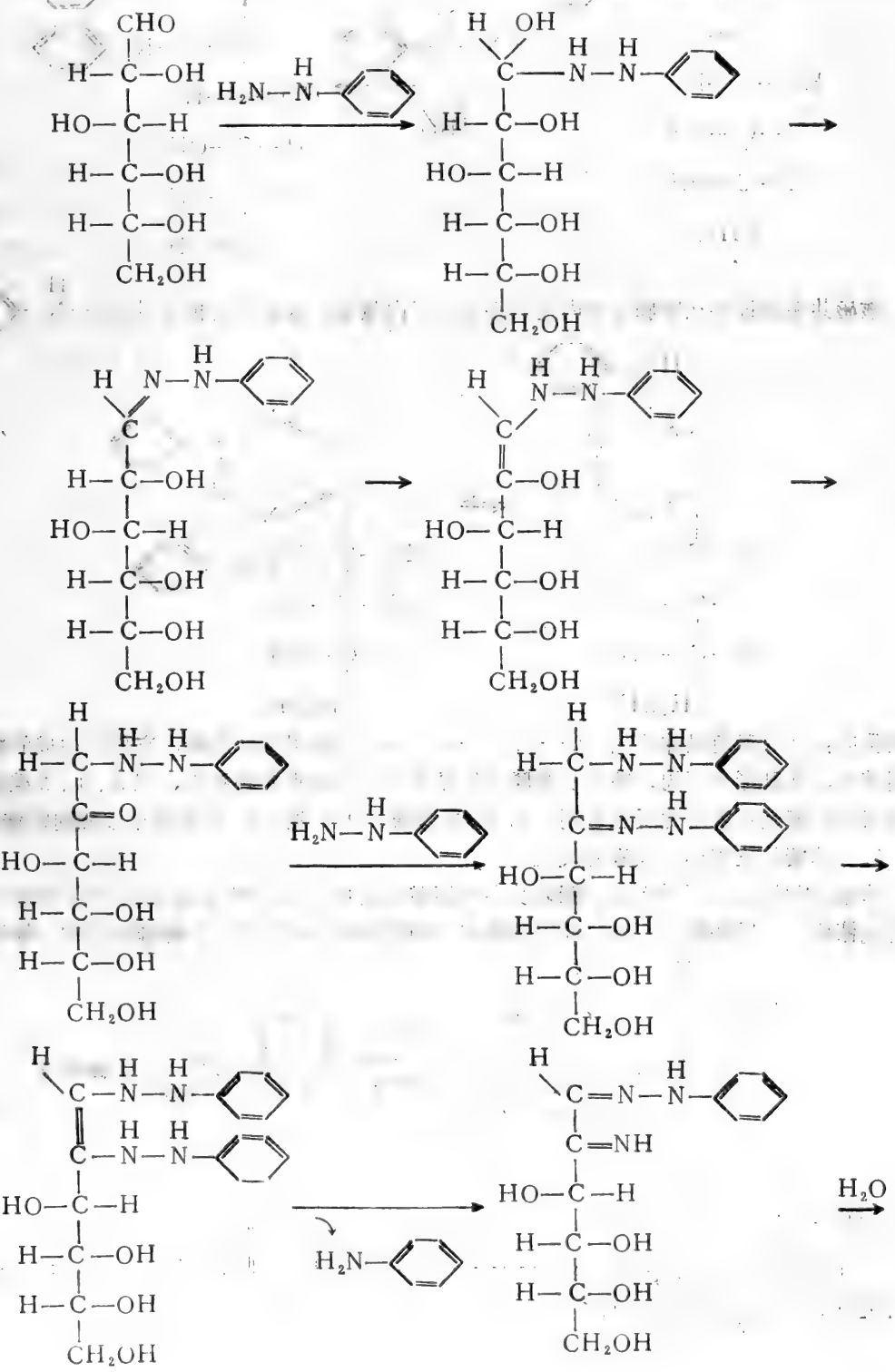
糖苷广布于生物界。中草药中有一种主要有效成分属糖苷类化合物。苦杏仁之所以能止咳是由于它含有一种有效成分——苦杏仁苷，它是一种羟腈化物（ $\text{HOCH}-\text{C}(\text{CN})=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{OH}$ ）的羟基与一种糖的苷羟基缩合而成的糖苷。中药中有些强心药也属于糖苷类化合物。植物体内的花青素也是与糖结合成糖苷而存在的。

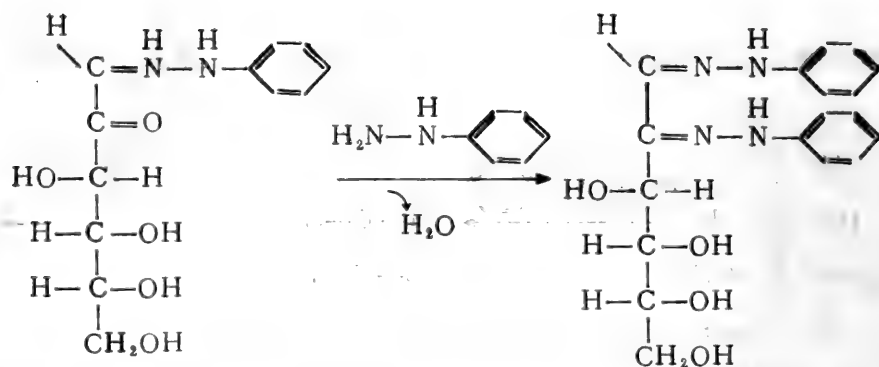
糖的苷羟基与另一分子糖的醇羟基或苷羟基脱水缩合而成的聚糖，实际上也属于糖苷。因此，聚糖中相互结合形成的键，称为糖苷键（glycoside linkage）。

4. 糖与羰基试剂的反应

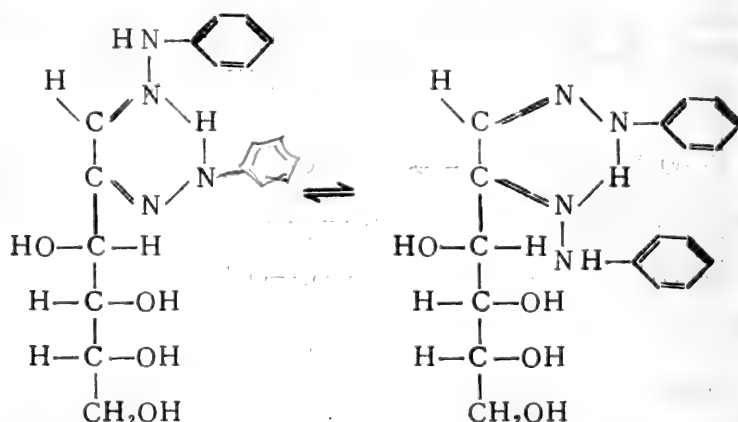
羰基试剂 NH_2-NH_2 、 NH_2OH 、 $\text{H}_2\text{N}-\text{N}(\text{C}_6\text{H}_5)-\text{C}-\text{NH}_2$ 、 $\text{H}_2\text{N}-\text{N}(\text{C}_6\text{H}_5)-\text{C}_6\text{H}_5$ 等胺的衍

生物，都能与糖反应，以苯肼($\text{H}_2\text{N}-\text{N}(\text{H})-\text{C}_6\text{H}_5$)为例进行讨论。苯肼与单糖反应生成糖脎。





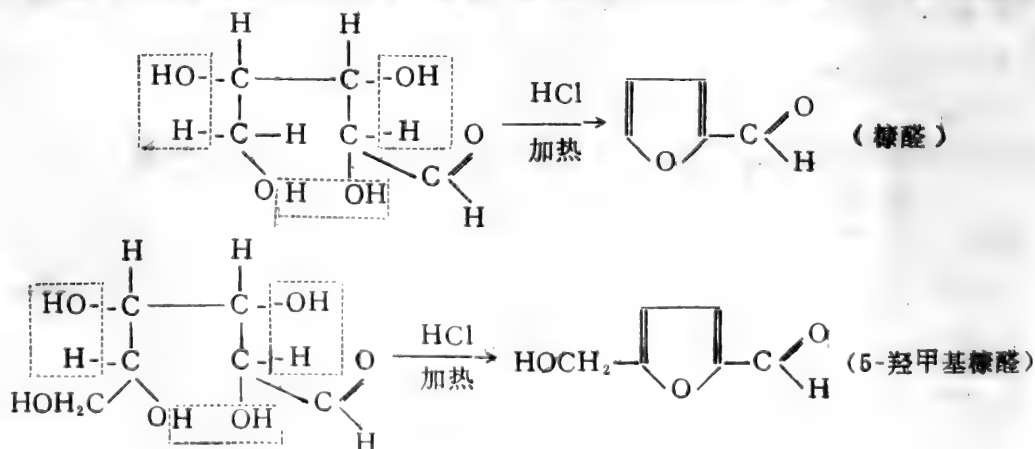
核磁共振谱证实糖脎分子内通常存在分子内氢键，因此不会再与 $\text{H}_2\text{N}-\text{N}-\text{C}_6\text{H}_5$

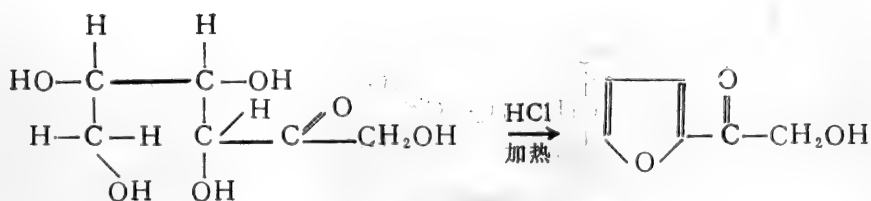


继续反应，而成黄色晶体析出。C—3、C—4、C—5 上构型不同的糖，它们所生成的糖脎有不同结构，其晶形也不同，因此从糖脎的结晶形状可以区别各种糖类，但 3、4、5 碳原子上构型相同的糖则不能用此反应鉴别，如 D-葡萄糖、D-果糖、D-甘露糖生成相同的糖脎。

5. 单糖的脱水作用及颜色反应

单糖在酸作用下可脱水生成糠醛及各种糠醛衍生物，如戊醛糖在 12% HCl 作用下可脱水生成糠醛，而已醛糖则生成 5-羟甲基糠醛。酮糖则脱水生成另一种糠醛衍生物。糠醛及其

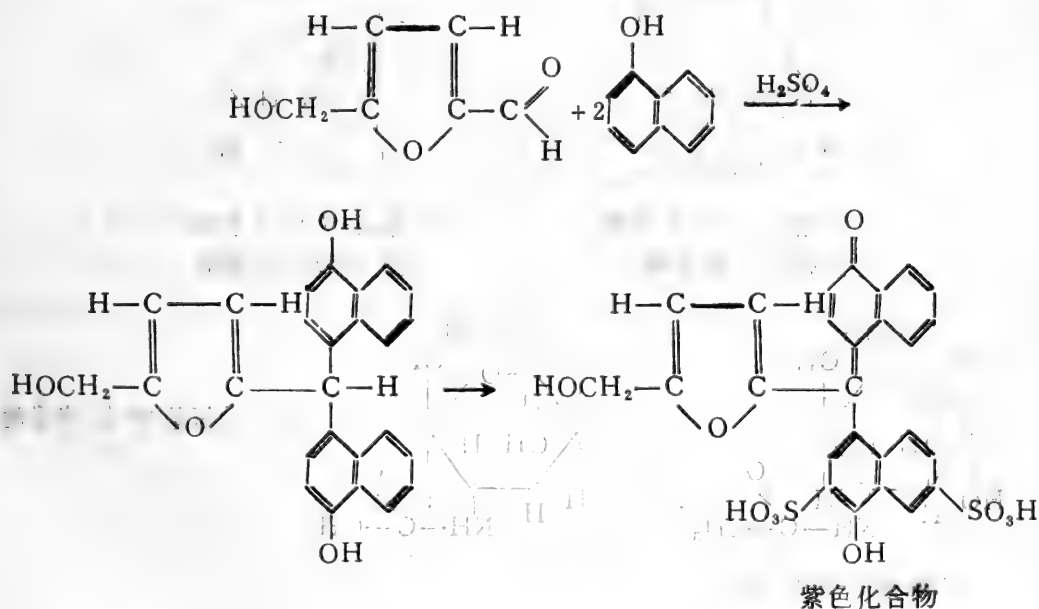




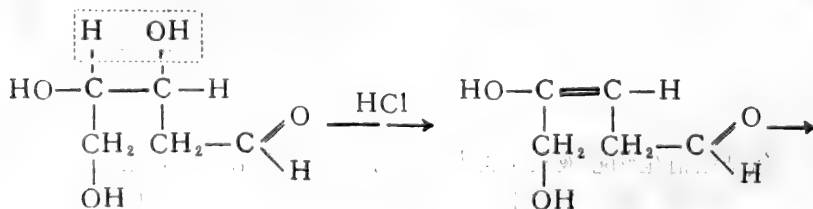
各种衍生物遇不同试剂可产生不同颜色反应，从而可鉴别各种糖类。如糠醛及其各种衍生物都能与 α -萘酚反应生成紫色，故常用此法鉴定糖类化合物是否存在，称 Molish 反应。酮糖的糠醛衍生物遇间苯二酚即迅速生成鲜红色，醛糖的糠醛虽亦有此反应，但只在高浓度时才呈阳性，因此可通过此反应来检验酮糖。另外，糠醛遇 1、3、5 苯三酚生成樱桃红色，遇甲基间苯二酚呈绿色，这两个反应可作为检验戊糖的特有反应。

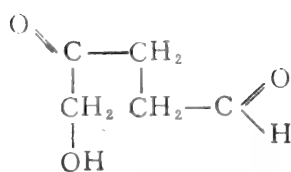
以上颜色反应都是糠醛及其衍生物与各种酚类化合物缩合成的有色物质而形成的。

如：



脱氧核糖在 HCl 作用下生成 ω -羟- γ -酮戊醛，遇苯胺呈蓝色，故常用此法测定脱氧核糖核酸。





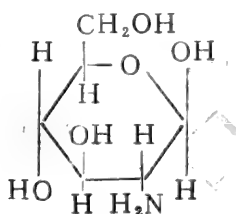
ω -羟- γ -酮戊醛

三、单糖衍生物

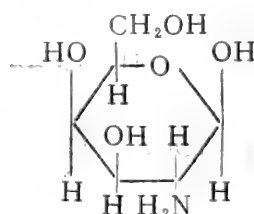
单糖衍生物种类繁多，除了上面介绍过的糖酸、糖醛酸、糖二酸和糖苷外，自然界中还有许多单糖衍生物以自由状态存在，或存在于多糖及糖蛋白等成分中。

(一)含氨基或乙酰氨基的单糖衍生物

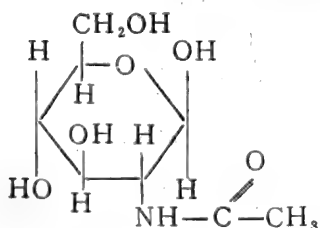
这类衍生物大部分是己糖的 2-C 上的羟基，为氨基或乙酰氨基取代后的衍生物。它们广布于各种结合糖如肽聚糖、糖蛋白的组分中，如：



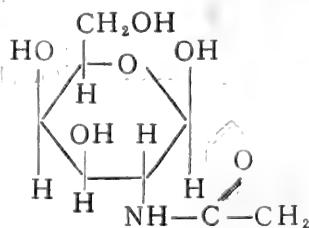
2-氨基- β -D-葡萄糖
或 2- β -D-葡萄糖胺



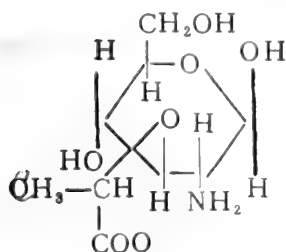
2-氨基- β -D-半乳糖
或 2- β -D-半乳糖胺



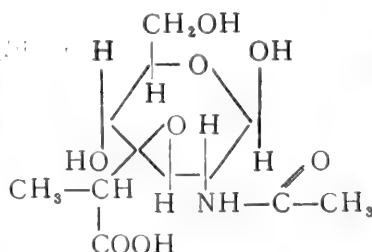
2-乙酰氨基- β -D-葡萄糖



2-乙酰氨基- β -D-半乳糖

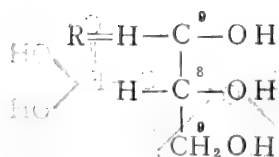
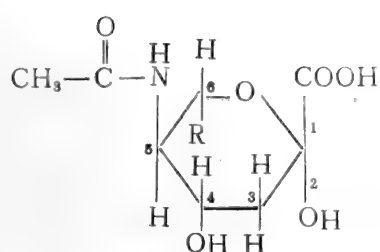


2-氨基-3-乳酸基
 β -D-葡萄糖或胞
壁酸 (NAG)



2-乙酰氨基-3-
乳酸基- β -D-
葡萄糖 (NAM)

还有一种重要的氨基糖衍生物唾液酸是含九个碳原子的酮糖衍生物，也是一种脱氧糖。唾液酸广布于各种类型细胞中，是许多糖蛋白和糖脂的组成部分。在许多哺乳动物组织中，有时



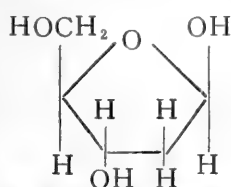
唾液酸即

N-乙酰-D-神经氨酸(NeuNAC)

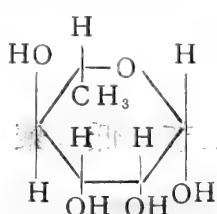
除乙酰衍生物外，还有由乙醇酰基取代乙酰基的唾液酸，也还有二乙酰基的衍生物，其第二个乙酰基位于 C-4、C-7 或 C-8 的羟基位置。

特一(二)脱氧糖

即单糖分子上某羟基脱去氧而生成的衍生物，脱氧糖也有多种，其中有些是 L-型糖。如以下几种。

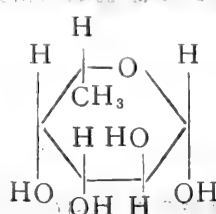


β -D-2-脱氧核糖



α -L-鼠李糖

或 α -L-6-脱氧甘露糖

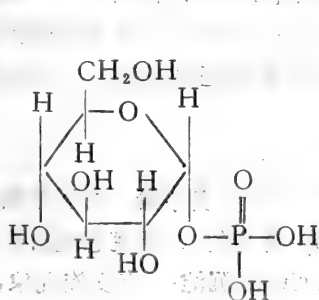


α -L-岩藻糖

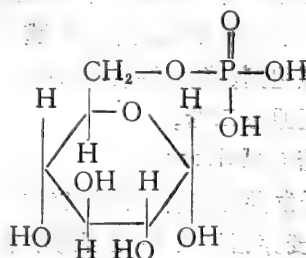
或 α -L-6-脱氧半乳糖

(三)单糖磷酸酯

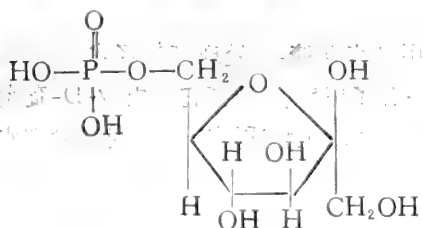
单糖的磷酸衍生物即单糖磷酸酯，它们参与生物体内许多生化反应，如糖类化合物的合成和分解的一系列反应都是以磷酸酯的形式进行的。重要的单糖磷酸酯如下：



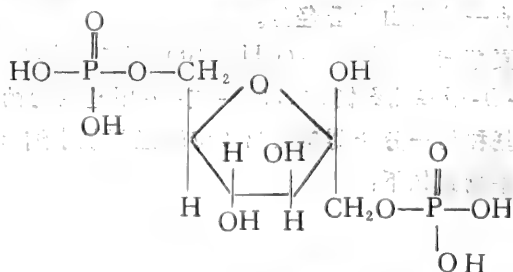
α -D-葡萄糖-1-磷酸 (G-1-P)



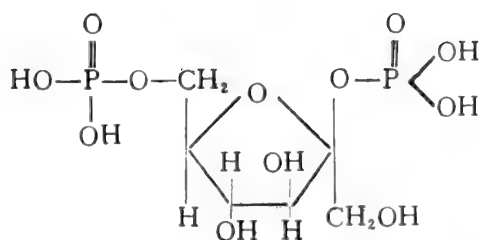
α -D-葡萄糖-6-磷酸 (G-6-P)



β -D-果糖-6-磷酸 F-6-P



β -D-果糖-1,6-二磷酸



β -D-果糖-2,6-二磷酸

以上各种糖的磷酸酯中，前四种都是糖代谢的重要中间物，最后一种是1980年才发现的一种单糖磷酸，它在糖代谢中起重要的调节作用。此外在核糖核酸和脱氧核糖核酸分子中有5-磷酸核糖和5-磷酸脱氧核糖。

第三节 低聚糖

低聚糖是由2—10个环状单糖以糖苷键结合而生成的化合物，生物体较重要的是二糖。

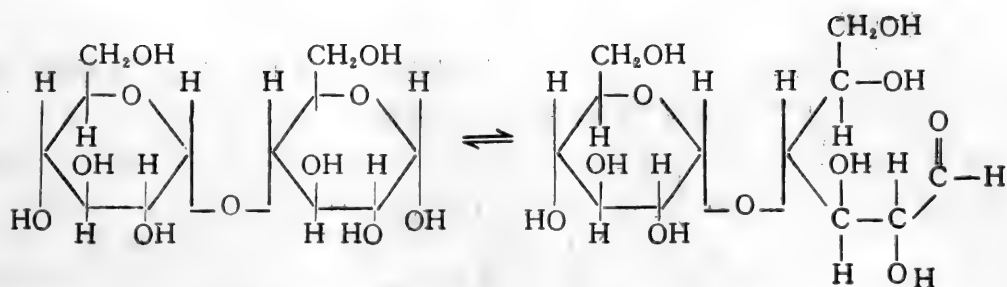
一、二糖

二糖由两分子单糖以糖苷键结合而成，又名双糖。由于键合形式不同，又分两类：一类是一个单糖分子的半缩醛羟基和另一单糖分子的某醇羟基脱水缩合而成；另一类是一个单糖分子的半缩醛羟基和另一单糖分子的半缩醛羟基脱水缩合而成。前者有一个单糖的半缩醛羟基仍处于自由状态，在水溶液中可经醛式而形成互变平衡混合物，所以它能还原Fehling's试剂等金属弱氧化剂，称为还原性二糖。后者已无自由半缩醛羟基存在，不能还原Fehling's试剂，称为非还原性二糖。

(一) 麦芽糖 (Maltose)

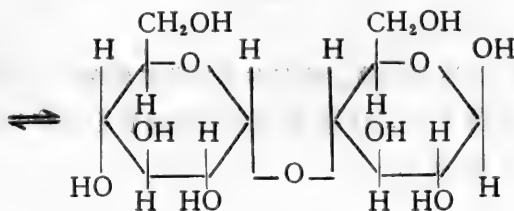
禾谷类种子发芽时在各种淀粉酶作用下，淀粉水解生成麦芽糖，由于该糖最初是在麦芽中发现，故名。麦芽糖可被 α -糖苷酶水解成两分子D-葡萄糖，故断定它是由两分子葡萄糖以 α -糖苷键结合而成。它能还原Fehling's溶液生成 Cu_2O 沉淀；有变旋现象，其平衡混合物的比旋为 130.4° ；能与苯肼生成麦芽糖脎；与溴水作用生成麦芽糖酸。从而可以断定麦芽糖中有一个自由的苷羟基。

麦芽糖用 CH_3I 或 $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ 处理，得八-O-甲基麦芽糖，处理产物经水解得2,3,4,6-四-O-甲基葡萄糖和2,3,6-三-O-甲基葡萄糖及一分子甲醇。证实它是由 α -D-葡萄糖的苷羟基和另一分子葡萄糖第4位醇羟基脱水缩合而成。从以上性质可以推出麦芽糖在水溶液中的平衡式如下：



α -麦芽糖

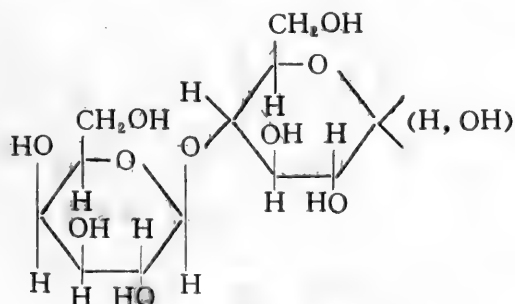
醛式麦芽糖



β -麦芽糖

(二) 乳糖(Lactose)

乳糖存在于哺乳动物乳汁中，人乳含乳糖6—7%。与麦芽糖一样，能还原 Fehling's 试剂产生 Cu_2O 沉淀；能产生一定晶形的乳糖脎；有变旋现象；其比旋值为 $[\alpha]_D^{20} = 52.3^\circ$ ，用溴水氧化生成乳糖酸。说明乳糖也是还原性二糖，其分子中有自由苷羟基。乳糖可被苦杏仁酶（一种专门水解 β -糖苷的酶）水解成一分子葡萄糖和一分子半乳糖，说明两种糖之间是以 β -糖苷键结合的。将乳糖酸水解，产生一分子半乳糖和一分子葡萄糖酸，说明乳糖是由 β -半乳糖的苷羟基与葡萄糖某醇羟基结合而成。用上述麦芽糖的同样方法，证明葡萄糖是因其4-位醇羟基与半乳糖的苷羟基结合，即用1,4- β -糖苷键结合。结构如下：



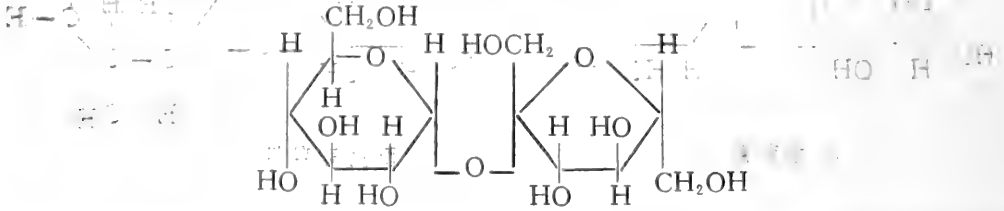
(三) 蔗糖(Sucrose)

蔗糖广布于植物界，而以甘蔗和甜菜中含量尤为丰富，在其他植物中作为糖的一种运输形式。

蔗糖无还原性；不能成脎；无变旋现象，其比旋固定在 $[\alpha]_D^{20} = +66.5$ ；水解产生一分子葡萄糖和一分子果糖，水解反应可被 α -D-葡萄糖苷酶催化，也可被 β -糖苷酶催化。说

明蔗糖是由 α -D-葡萄糖和 β -D-果糖各以其苷羟基脱水缩合而成的。

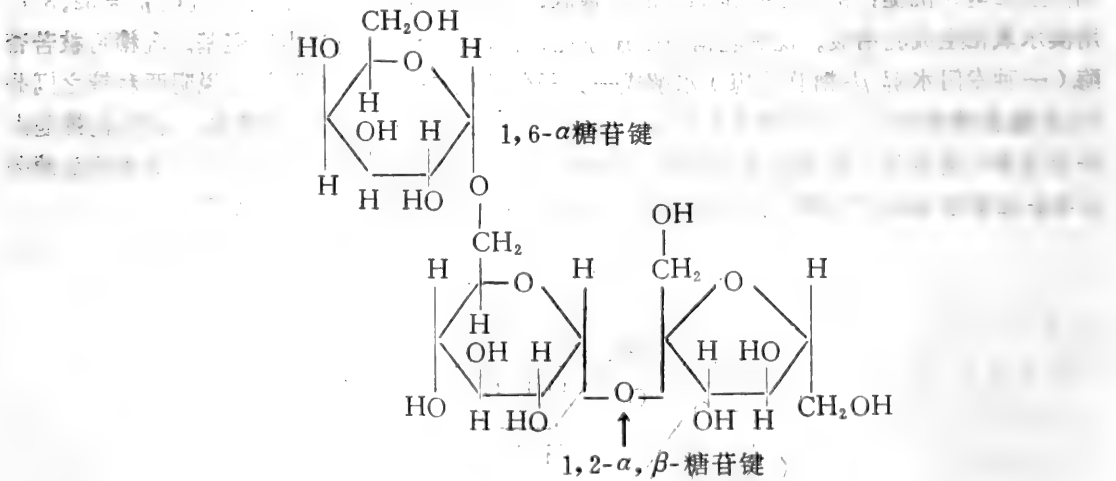
蔗糖经甲基化再水解得 2, 3, 4, 6-四-O-甲基葡萄糖和 1, 3, 4, 6-四-O-甲基果糖, 说明其分子中的葡萄糖是吡喃型, 而果糖则是呋喃型。结构如下式。



除了上面所讨论的二糖外, 还有海藻二糖存在于海藻及霉菌中; 龙胆二糖存在于昆虫体液及中药苦杏仁中。前者是由两个 α -D-葡萄糖分子各以其苷羟基结合而成; 后者则由两个葡萄糖分子以 1, 6- α -糖苷键结合而成。

二、叁糖 (Trisaccharide)

自然界中的三糖较少, 较重要的有棉子糖 (Raffinose), 存在于棉子中, 甜菜中亦有存在, 用甜菜制糖时, 糖蜜中有大量棉子糖。棉子糖用一种 α -半乳糖苷酶 (蜜二糖酶) 水解得半乳糖和蔗糖, 常用此法增加甜菜的产糖率。棉子糖结构如下式。



第四节 多 糖

许多单糖分子以糖苷键结合而成的大分子统称多糖。多糖一般按三个结构因素来分类: ①构成多糖的单体的等同性如何; ②单体之间的键合形式; ③单体的残基序列。

一、同聚多糖 (Homopolysaccharide 或 Homoglycan)

由同一种单糖缩合而成的多糖统称同聚多糖, 自然界一些重要的、大量存在的多糖包含

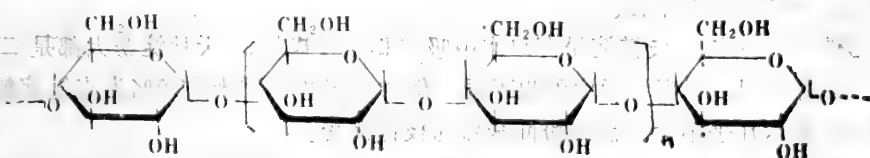
于其中。

(一) 淀粉和糖元 (Starch and Glycogen)

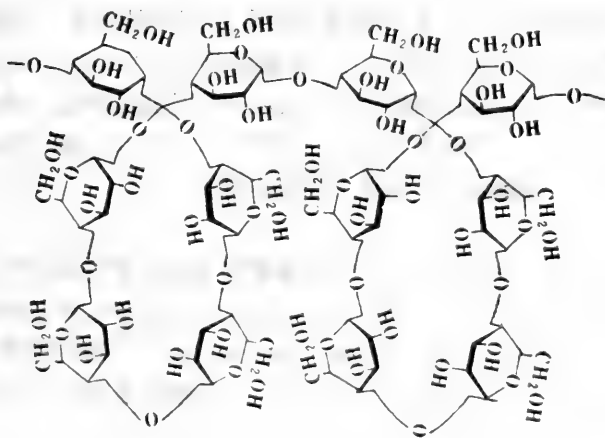
前者是植物中的贮藏多糖，后者是动物中的贮藏多糖。它们都是由许多 α -D-葡萄糖分子缩合而成。由于键合的类型不同，所以有的是线型分子，有的则由许多支链构成。淀粉只存在于植物中，呈颗粒状存在于植物细胞的细胞质中，也存在于叶绿体质粒中。糖元则以颗粒状存在于高等动物肝细胞及肌肉组织中，也存在于微生物中。按键合形式不同，淀粉分为直链淀粉 (amylose) 和支链淀粉 (amylopectin) 两类，而糖元都是支链的，但支链比淀粉多得多。

1. 直链淀粉

直链淀粉是由许多 α -D-葡萄糖以 1,4- α -糖苷键结合而成的，分子量约 60,000—100,000dt.，它虽是线型分子，但其链不是完全伸直的，而是绕成螺旋状构象。每圈螺旋约为六个单糖单位。直链结构及其螺旋构象如图1—5。



1—5(a)



1—5(b)

图1—5 直链淀粉结构及构象

(a)为直链淀粉结构式 (b)为螺旋构象

2. 枝链淀粉

其分子量较直链淀粉为大，约为 500,000—1,000,000dt.。由于有少数 1,6-糖苷键存在，因而就在那儿形成分枝点，形成若干分枝，如图1-6。

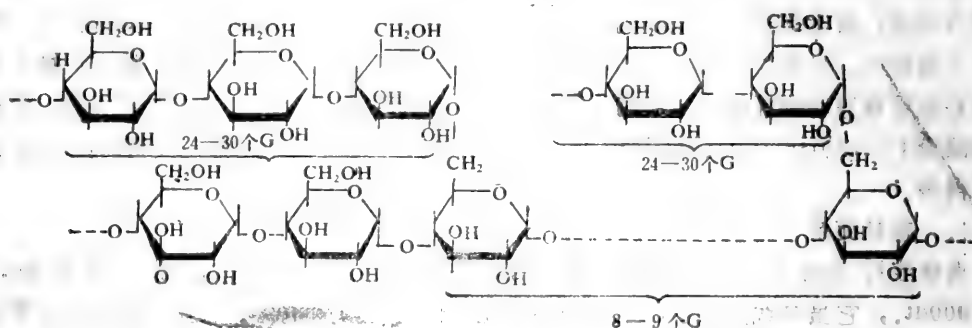


图1-6 枝链淀粉结构式

每个枝链淀粉分子约有50个分枝，每个分枝长约24—30个葡萄糖单位，而每个分枝间的距离约间隔8—9个葡萄糖单位。

直链淀粉溶于热水，枝链淀粉在热水中吸水膨胀成糊状。天然淀粉大都是二者的混合物。来源的品种不同，二者含量比例也不同。例如玉米和秈稻米中20%为直链淀粉，80%为枝链，糯米和粳米几乎不含直链淀粉而全部为枝链淀粉。

直链淀粉遇碘呈蓝色，而枝链淀粉则呈紫色。淀粉水解过程中形成分子大小不同的各种中间产物，统称糊精，分子大小不同遇碘所显颜色也不同，因此有蓝、红、无色等不同糊精。

3. 糖元

糖元结构类似于枝链淀粉，但 1,6-糖苷键较多，即分枝较多，一般主链为 1,4- α -糖苷键，含有12—18个糖残基；主链上每隔三个葡萄糖单位就会有一个分枝，分枝上又产生分枝，也相隔三个葡萄糖单位；最外围的分枝约长6—7个葡萄糖单位，其分子量约为 2.7×10^5 — 3.5×10^6 。糖元溶于沸水中，遇碘呈红色。肝糖元的合成和分解可迅速调整体内的血糖水平，糖元的多分枝结构为迅速调整血糖水平提供条件。

(二)纤维素

纤维素为植物纤维部分的主要成分，是自然界存量最丰富的化合物。棉花含97—99%的纤维素，木材含41—53%的纤维素，它们构成植物的支撑组织和保护组织。

纤维素部分水解可得纤维二糖，而彻底水解则和淀粉一样得许多葡萄糖，所以纤维素是许多葡萄糖以 β -1,4-糖苷键结合而成的线形分子。天然纤维素的葡萄糖残基上的赤道键羟基可形成氢键，许多纤维素链即赖此大量氢键集结成片层或纤维束。纤维素的高强度、高稳定性和不溶于水等特性，都与此有关。在植物细胞壁中，这些纤维素纤维紧密地包成层，并进一步用其它多糖物质如半纤维素、果胶质、木质素等填充其中，以增加其强度。半纤维素主要是 D-木糖的聚合物；果胶主要是 D-半乳糖醛酸甲酯的聚合物。木质素结构尚未弄清。

纤维素不溶于水。除反刍动物外，其它高等动物的口腔、胃、肠都不含纤维素酶，不能把

纤维素水解，所以纤维素对人及动物都无营养价值，但有利于刺激肠胃蠕动，吸附食物，帮助消化。某些微生物、菌类、藻类及各种昆虫，特别是反刍动物胃中的细菌含有纤维素酶，能将纤维素水解。近年来已筛选出富含纤维素水解酶的微生物，它们能将纤维素水解成纤维二糖和葡萄糖等。

纤维素可溶于氢氧化铜氨溶液 (Schweitzer's 试剂)，也可溶于 $ZnCl-HCl$ 溶液和 $NaOH-CS_2$ 混合液中。

由于纤维素具亲水性，并对不同化合物亲和力有差别，因此在生化研究中可作为层析载体。把纤维素接上其它化学基团可制成各种离子交换纤维素，其中常用于生化分析及生物物质分离的有 DEAE—纤维素、QAE—纤维素等阴离子交换纤维素和羧甲基纤维素、磷酸纤

纤维素、磺酸纤维素等阳离子交换纤维素。它们是由 $(CH_3CH_2)_2N-CH_2CH_2-$ 、 $R-\overset{\overset{R}{|}}{\underset{\underset{R}{|}}{N}}-$

CH_2CH_2- 、 $-CH_2COOH$ 、 $-O-\overset{\overset{O}{||}}{P}-OH$ 、 $-SO_3H$ 等基团取代了纤维素中羟基上的氢而

形成的。

纤维素上的醇羟基亦可被 HNO_3 、 HAC 等酯化而形成各种纤维素酯，前者形成的纤维素酯可作炸药、人造丝、塑料等，后者形成的纤维素酯可作为层析载体分离多种生化物质。

(三) 几丁质

某些低等植物包括菌类、藻类以几丁质代替纤维素作为结构物质，一些低等动物如节足动物、环节动物以几丁质代替胶原蛋白作为结构物质。由于几丁质是由 2-乙酰氨基- β -D-葡萄糖以 β -1,4-糖苷键结合而成的，所以又名 2-乙酰氨基纤维素。它也象纤维素一样能以链间氢键形成集合体片层。它还可与蛋白质结合成为几丁质-蛋白质复合物，作为结构物质。

(四) 葡聚糖

葡聚糖又称右旋糖酐，在某些酵母和细菌中都存在，可作为代血浆，使血液维持一定渗透压。其结构首先是 α -D-葡萄糖以 α -1,6-糖苷键结合，然后又以 α -1,2-和 α -1,3-糖苷键形成交链。在生物化学上可用 CH_2-CHCH_2Cl 作交联剂制备葡聚糖凝胶，以此作分子筛可

分离分子大小不同的物质。

除以上同聚多糖外，菊芋等菊科植物含有菊糖，它是由 β -D-果糖以 β -1,2-糖苷键结合而成。上述果胶质也是重要的同聚多糖。

二、杂聚多糖 (Heteropolysaccharide 或 Heteroglycan)

这类多糖是由两种以上不同单糖或其衍生物缩合而成的多糖。它们的存量虽不及同聚多糖大，但种类很多，在生物体内都各有特殊功能。

(一) 粘多糖

这是一类较重要的杂多糖，它们是由氨基糖或乙酰氨基糖和糖醛酸缩合而成的杂多糖的总称。其中较重要的是含硫酸和磺酸基的一类酸性多糖。如肝素、透明质酸、硫酸软骨素等。

1. 肝素 (Heparin)

肝素是血液的抗凝物质，医药上用它作输血时的抗凝剂和防治血栓形成。它又能中和体内与过敏性反应有关的物质——组胺，以减轻过敏反应。近年来用肝素连接在琼脂糖上，作为分离各种酶的亲和层析基质。

肝素是由 L-艾杜糖醛酸和磺酰氨基葡萄糖-6-硫酸酯及葡萄糖醛酸以 1,4-糖苷键缩合而成的，结构如图 1-7 所示。艾杜糖 2-位-羧基形成硫酸酯后则称硫酸肝素。肝素存在于动物大动脉、肝、肺和各种神经细胞膜表面。硫酸肝素存在于肺、皮肤、肝、肠等肥大细胞及嗜碱白细胞中。其分子量为 17,000—20,000 dt。

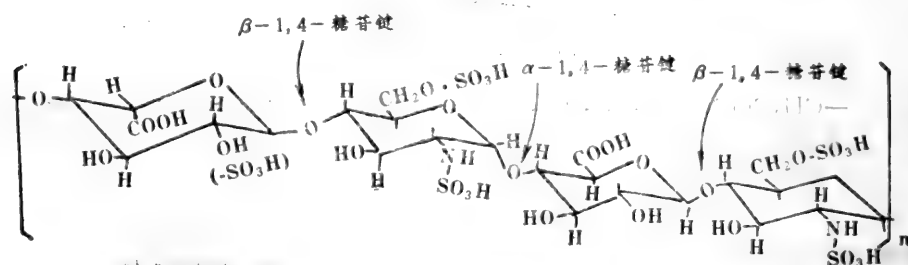


图1-7 肝素的化学式

2. 透明质酸

透明质酸是构成动物结缔组织基本物质的主要组分，亦存在于关节滑液、眼球玻璃体液、脐带、肿瘤组织及某些细菌的细胞壁中。它是由 2-乙酰氨基葡萄糖和 D-葡萄糖醛酸缩合而成的如图 1-8。

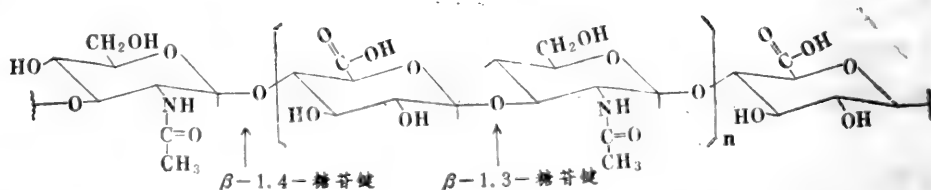


图1-8 透明质酸的结构

透明质酸在生物体中的功能多种多样，在细胞间质中其作为各细胞间的粘合剂，在眼球玻璃体液、关节液和脐带中作为润滑剂，此外对组织能起保护作用，以防外来致病微生物或生理毒物的透入。一旦它遭到酶解，活体内这道天然屏障即被解除。

此外软骨、角膜、皮肤韧带、肌腱、血管等含有各种软骨素和硫酸软骨素。它们大多是由 D-葡萄糖醛酸或 L-艾杜糖醛酸和 2-乙酰氨基葡萄糖-6-硫酸酯以 β -1,3-糖苷键缩合而成。

三、结合多糖

这类多糖与寡糖在生物体中与肽、蛋白质或脂质结合而形成肽聚糖、糖蛋白和糖脂等。由于糖链结构复杂，使它们具有很大的信息容量，对细胞专一性识别某种物质并进行相互作用而影响细胞代谢，以及细胞间的通讯等都具有重要作用。

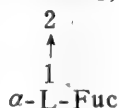
(一) 抗原性糖蛋白中的血型抗原

血型抗原是指细胞表面糖蛋白中的杂多糖具有抗原性。这些抗原性杂多糖常有三种不同组分，形成 A、B、H 三种抗原，这是人显现不同血型的原因。H 抗原实际上存在于 A、B、O 型血的所有红细胞表面，O 型血中它完全暴露；A 型血中还连有 A 抗原决定性组分，B 型血中则连有 B 抗原决定性组分；而 AB 型血中则既连有 A 又连有 B 抗原决定性组分。O 型血人的血清中含有抗 A 和抗 B 同种凝集素，所以只能接受 O 型血而不能接受其它血型的血。A 型血人血清中含有抗 B 同种凝集素。B 型血人血清中含有抗 A 同种凝集素。AB 型血人血清中既不含 A 也不含 B 同种凝集素。所以 A-型、B-型、AB-型血的人都能接受 O-型血。其它类推。

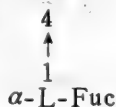
血型大分子是一种糖蛋白，其枝链杂多糖从肽链的丝氨酸或苏氨酸伸出。各种血型杂多糖结构见26页式中。

式中除各血型糖共同结构部分外，O-型血的糖只有 H 结构部分，这也是各血型糖的共同部分。A 型血的糖上下两个分枝上多连一个 α -D-GalNAC-1,3，这时 H 抗原性似乎被 A 抗原掩盖了，只显 A 抗原性。如果上下两个分枝不连 α -D-GalNAC 而用 α -D-Gal-1,3，代替，则只显 B 抗原性。这些抗原性糖蛋白分子，分子量为 $2 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ dt，含 85% 的糖和 15% 的蛋白质。糖抗原性专一部位处于多糖非还原端的一段寡聚糖。

另外有一些人的血红细胞带有 ABO 系统抗原，而体液则不带此抗原，但带有 Lew's 系统抗原，26页式中 Lew_a 无 β -D-Gal-1,3- β -D-GluNAC，而代之以

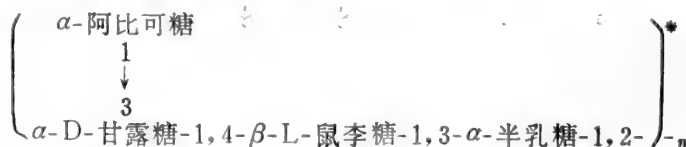


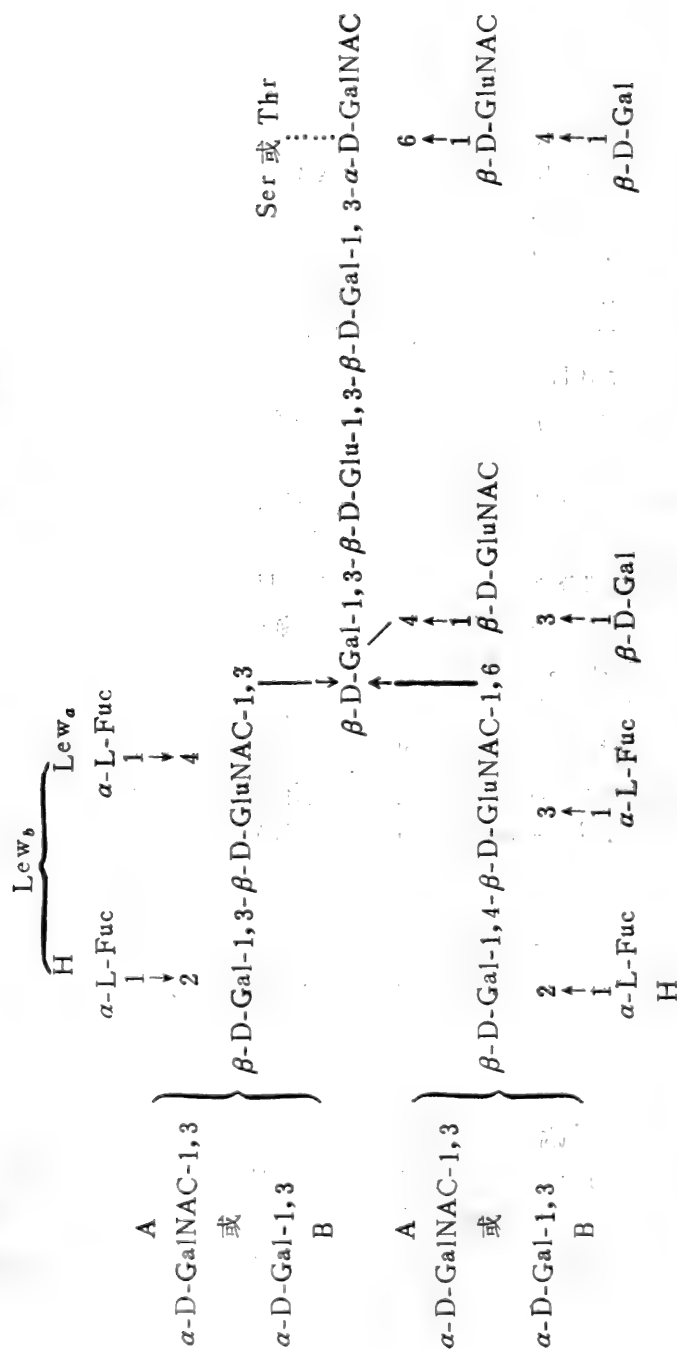
以 β -D-Gal-1,3- β -D-GluNAC Lew_b 则比 H 多一个 α -L-Fuc。



(二) 细菌细胞壁和荚膜中的抗原性脂多糖

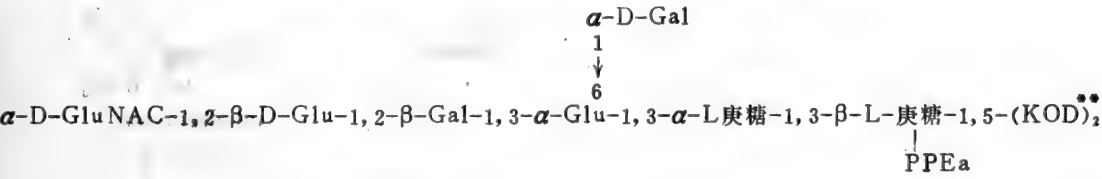
细菌细胞壁的最外层是由高分子支链杂多糖所构成，具抗原性，称 O-抗原。各种 O-抗原的重复单位是由 D-葡萄糖、D-半乳糖、D-甘露糖、D-半乳糖胺和 D-葡萄糖胺以及一些脱氧糖如 L-岩藻糖、L-鼠李糖等所组成。如鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella Typhimurium*) 的细胞壁多糖，其脂多糖的 O-抗原结构示如下式：



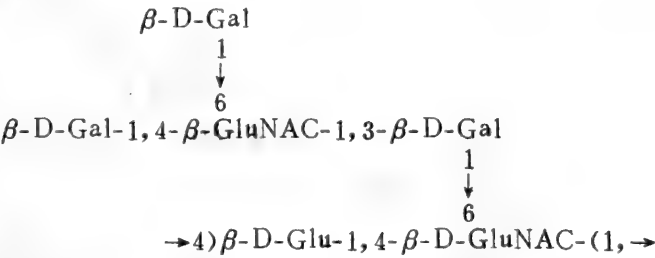


注：式中 Gal 代表半乳糖，GalNAC 代表 2-乙酰氨基半乳糖；Glu、GluNAC、L-Fuc 等各代表葡萄糖、2-乙酰氨基葡萄糖、岩藻糖等；A、B、H 等各代表不同血型糖的结构。

这个 O-抗原经过一核心多糖与脂质相连，即由 O-抗原最后一个寡糖单位的 D-半乳糖以 1,4-糖苷键与核心多糖第二个糖残基—D-葡萄糖结合。核心糖的结构为：



除细胞壁外，有些革兰氏阴性细菌松散结合的荚膜也具有抗原性多糖，如肺炎球菌荚膜抗原 SⅡ 是一个分子量为 240,000dt 的杂多糖，它是由 48% 的 L-鼠李糖、16% 的 D-葡萄糖醛酸、35% 的 D-葡萄糖结合而成的分支多糖。抗原 SⅡ 是纤维二糖醛酸以 1,3-糖苷键结合而成的高分子多糖。还有 SⅦ 和 SXIV 抗原等都是些单糖重复结合而成。如肺炎球菌 SXIV 抗原结的构为：

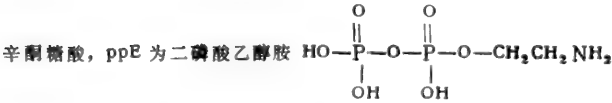
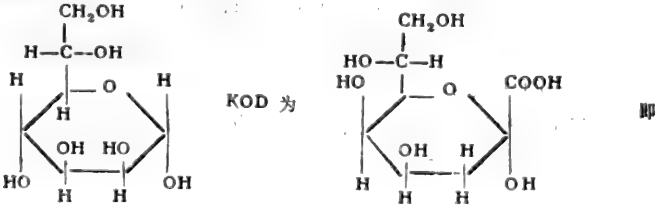


(三) 肽聚糖 (Peptidoglycan)

肽聚糖是细胞壁中的一种结合杂多糖，是由 2-乙酰氨基葡萄糖和 2-乙酰氨基葡萄糖乳酸两种糖残基相间结合而成的杂多糖，再用短肽交联起来而成的复杂结构。部分结构如图 1—9 所示。

总之，结合多糖特别是糖蛋白，在动物体液和细胞中尤为丰富。它与生物体的许多功能有关系。按特殊糖蛋白的功能来分，有激素、抗体、酶、受体蛋白、运输蛋白、生长调节蛋白、细胞识别蛋白、血型蛋白、多分子集合体结构稳定蛋白等。大部分存在于表面复盖层及

注：*α-阿比可糖为 3,6-二脱氧-α-半乳糖；
 **α-L-庚糖结构为：



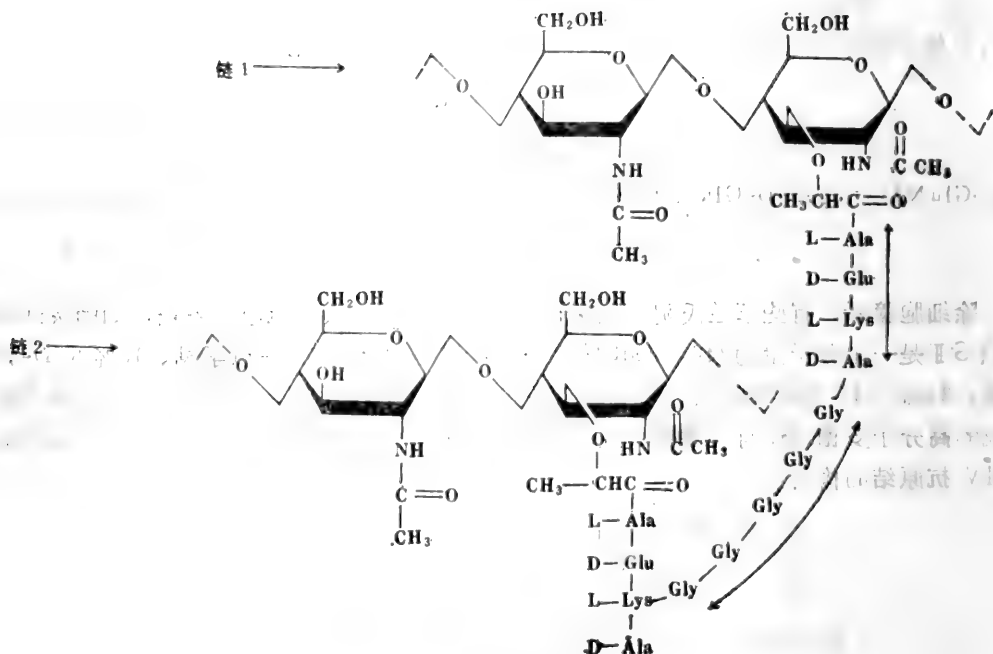


图1—9 肽聚糖的部分结构

细胞质膜。它代表一类有意义的生物分子，至于这些分子为什么要有糖存在的问题，现今还有争论，其中一种假说认为糖结合到蛋白质上是在高尔基体中进行的，它是一种识别标记，用来标记蛋白质，以预示它将用于细胞外面或用于细胞网膜中。而那些保存于或用于细胞质中的蛋白质，都是非糖基化的。有明显证据证明这个假说基本立论是真实的，即糖组分是在蛋白质上的附加识别因子。简言之，专一性结合糖蛋白于其它分子或分子集合体上，都是根据所结合的糖组分而决定的。

糖蛋白中的糖，显示很大差异。从量来说，可以低到1%，或高到80%，高于4%的糖蛋白有时称粘蛋白（有粘性）。糖与蛋白的结合是糖的苷羟基与蛋白质的某丝氨酸、苏氨酸、门冬酰胺或赖氨酸（在胶原中）以糖苷键的形式进行的。

存在于糖蛋白中寡聚糖的单体，从以上例子来看，包含 D-Gal、D-Gal NAC、Glu、D-Glu NAC、L-Fuc、D-Man、唾液酸等，其中唾液酸特别重要。其低聚糖总的特征往往按以下几方面来分：①按糖残基组分来分；②按序列中糖苷键类型来分；③按单体序列来分；④按糖与蛋白质键合性质来分。

糖蛋白的许多功能与通讯联络、传递信息有关，如细胞—细胞的识别，细胞—分子的识别，细胞器—分子的识别以及分子—分子的识别。很明显，所有生命机体的这些识别现象，特别是在细胞—细胞水平上的识别都是具有重要意义的正常过程。这些过程的失常，常会引起疾病，其中包括癌症。

第二章 脂 类

脂类包括多种化合物，它们都具有低水溶性的特征。大部分脂类化合物，由于结构上的共性，不仅有低水溶性特征，而且具有重要的生物学特性。脂类主要是碳氢化合物的衍生物，其中有些既含亲水的极性基团，又含疏水的碳氢基团，属单极性化合物(amphiphiles)。这些单极性化合物的性质主要受其所含各基团的影响。因此有些脂类缺乏亲水能力，主要以无水状态贮存于组织中，这些脂类可转移和运输到其它组织，在那儿它们进行氧化，以提供维持生命各代谢过程所必需的能源。另一类脂类是极性较强的脂类，属强单极性化合物，它们主要是构成各种生物膜的结构组分，用以分隔细胞和组织。脂类化合物由于都有碳氢长链或疏水脂环，所以大部分可用乙醚、氯仿等非极性溶剂从动、植物组织或细胞中提取出来。这类化合物虽结构多种多样，但大部分是酯类化合物及其衍生物。

按脂类的成份不同，可分为下列四类：

- (一)中性脂肪酸甘油酯。又称中性脂肪或酰基甘油酯，又称三酰甘油。
- (二)由甘油、脂肪酸、磷酸以及一些含氮碱构成的离子型酯。又称甘油磷脂。
- (三)不含甘油的脂类。包括神经鞘脂类、蜡和类固醇等。
- (四)脂类与其它化合物结合而成的复合脂类。如脂蛋白、糖脂等。

本章主要介绍前三类，第四类在相应章节再作介绍。

第一节 酰基甘油酯 (Acylglyceride)

酰基甘油酯简称酰基甘油 (Acylglycerol)，是由甘油的羟基和脂肪酸的羧基脱水结合而成的酯类化合物。在生物体内存在的酰基甘油酯，大部分是甘油的三个醇羟基与三个脂肪酸分子脱水结合而成，又称为三酰甘油酯 (Triacylglyceride)。但也有少量单酰甘油酯和二酰甘油酯存在，特别是在脂代谢过程中，它们作为中间物而存在。

一、构成酰基甘油酯的脂肪酸

从动物、植物、微生物的酰基甘油酯中分离的脂肪酸约有百余种，其中常见者列于表2-1中。

虽然任何机体内存在的脂肪酸常多种多样，但也只有少数几种在体内占优势。如高等植物大多含十六酸和两种不饱和脂肪酸—油酸和亚油酸。饱和的十八酸几乎不存在，20:0和24:0酸极为稀有。但某植物种群常含有不常见的脂肪酸，成为该种群所特有的成分。例如鸢尾科含炔类脂肪酸；蓖麻子则含特有的羟基脂肪酸—蓖麻酸等。

动物象植物一样也含有软脂酸和油酸，但动物还含有大量硬脂酸，还含有20:0、22:0和24:0等脂肪酸。一般来说动物中脂肪酸种类比给定品种的植物为多。

表2-1 天然脂类中的脂肪酸

名 称		结 构	M.P. ℃	简 写
系 统 名	习惯名			
丁 酸	酪 酸	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	-4.26	4:0
十二酸	月桂酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	44	12:0
十四酸	豆蔻酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	58	14:0
十六酸	软脂酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	63	16:0
十八酸	硬脂酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	70	18:0
廿 酸	花生酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	77	20:0
廿四酸	掬焦油酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$	85.5	24:0
廿六酸	蜡 酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{24}\text{COOH}$	88.89	26:0
十八烯-9-酸	油 酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	16.3	18:1(9c)
十八二烯-9,12-酸	亚油酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	-5	18:2 (9c, 12c)
十八三烯-9,12,15-酸	亚麻酸	$\text{CH}_3\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	11.3	18:3 (9c, 12c, 15c)
十八三烯-9,11,13-酸	桐油酸	$\begin{array}{ccccccc} & \text{H} & \text{H} & & \text{H} & \text{H} & \\ & & & & & & \\ \text{CH}_3(\text{CH}_2)_8 & \text{C} & = & \text{C} & - & \text{C} & = & \text{C} \\ & & & & & & & \\ & & & \text{H} & & \text{H} & & \end{array}$ $(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	49	18:3 (9, 11, 13c)
廿-四烯-5,8,11,14-酸	花生四烯酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	-49.5	20:4(5c, 8c, 11c, 14c)
廿四-烯-15-酸	神经酸	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{C} = \text{C} - (\text{CH}_2)_{13}\text{COOH} \end{array}$	68	24:1(15c)
12-羟-十八烯-9-酸	蓖麻酸	$\begin{array}{c} \text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CHCH}_2\text{CH} \\ \\ \text{OH} \\ = \text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH} \end{array}$		
2-羟廿四酸	羟神经酸	$\begin{array}{c} \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{CHCOOH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$		
13(2-环戊烯)十三酸	大枫子酸	$\begin{array}{c} \text{CH}=\text{CH} \\ \quad \diagup \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2 \end{array} \text{CH}(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$		

在微生物中，多双键的不饱和脂肪酸大都不存在，但分枝的脂肪酸、含环丙烷的脂肪酸、含羟基的脂肪酸等则常常存在。并且常有未酯化的自由脂肪酸存在。

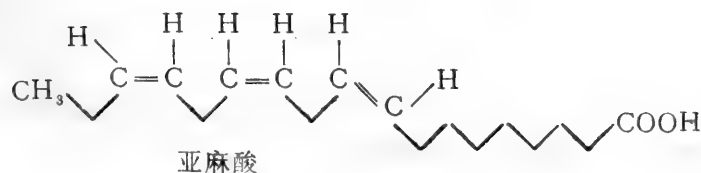
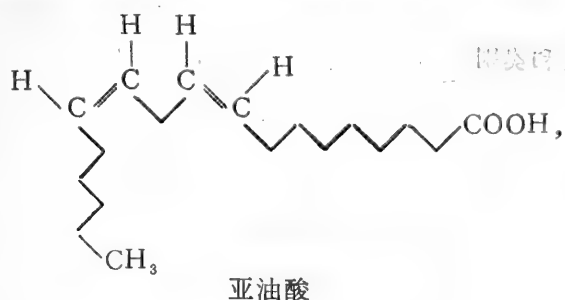
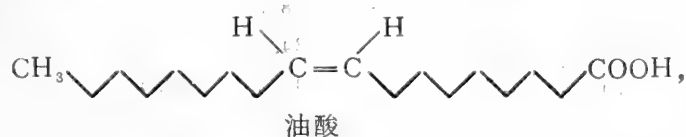
脂肪酸在一定有机体中的分布是不一致的。例如生物膜的脂类组分中90%为磷脂，与含三酰甘油的贮脂相比，磷脂中不饱和脂肪酸的含量更高。

从表2—1所列各种脂肪酸可以看出，它们具有下列共性：

(一)大多数脂肪酸含偶数碳原子，碳原子数在10—20之间，大多数为16—18个碳原子，只有动物乳脂中，脂肪酸的碳原子数在12以下。

(二)含一个双键的脂肪酸其双键位置大多在9—10碳原子间；含多个双键的脂肪酸，总有一个双键位于9—10碳原子间，其它双键渐次更远离羧基。

(三)含有双键的脂肪酸绝大多数为顺式构型。



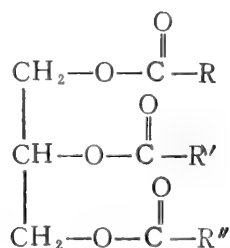
(四)一般来说动物体脂所含的脂肪酸以饱和脂肪酸较多。几种动植物脂类中脂肪酸成分如表2—2。

表2—2 一些动植物脂类中各种脂肪酸的百分含量

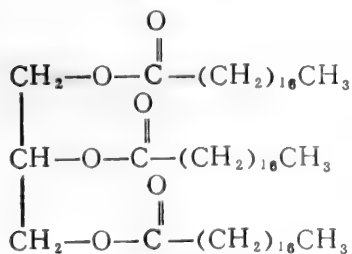
动植物脂种类	脂肪酸碳原子数及双键数								蓖麻酸
	14:0	16:0	18:0	16:1	18:1	18:2	18:3	20:4	
人(贮脂)	3	23	6	5	50	10	—	—	87.8
牛 脂	4	30	25	5	36	1	—	—	
猪 脂	1	28	15	3	42	9	—	—	
羊 脂	2	25	26	—	42	5	—	—	
玉 米 油	—	13	2	3	42	9			
核 桃 油	—	5.1	2.5	—	28.9	47.6	15.9	—	
亚 麻 油	—	5.4	3.5	—	9.9	42.6	38.1	—	
橄 榄 油	—	6.0	4.0	—	8.3	7.0	—	—	
向日葵油		3.5	2.9		34.1	58.5	—	—	
芝 麻 油		9.1	4.3		45.4	40.4	—	—	
蓖 麻 油	—	—	0.3	—	7.2	3.6			
花 生 油		6.3	4.3		61.1	21.8		5.9	

二、三酰甘油酯的结构和类别

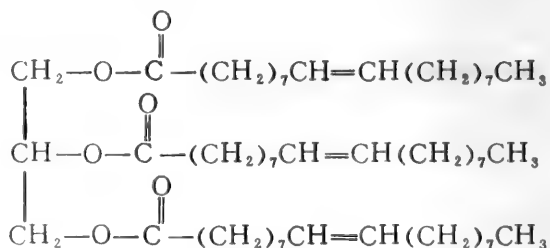
三酰甘油酯的通式为：



由于三酰甘油酯的 R、R' 和 R'' 结构可以不同，因而可形成不同类型的三酰甘油酯。如果 R = R' = R''，则此三酰甘油称为简单三酰甘油酯如：



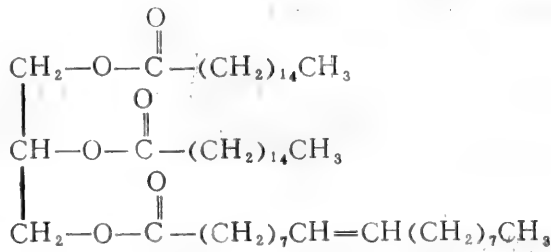
三硬脂酰甘油酯



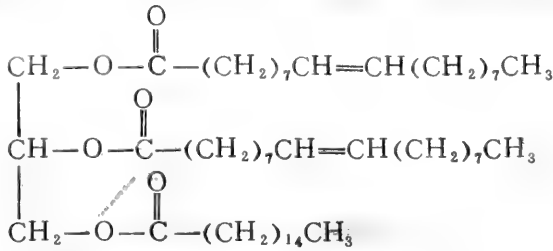
三油酰甘油酯

如果三个脂酰基不同，则该三酰甘油酯称为混合甘油酯。在混合甘油酯中各脂酰基由于

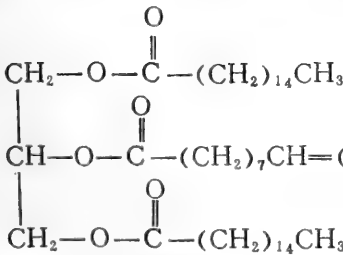
位置不同，又有不同的异构体，有些还有旋光异构体。如油酸和软脂酸所形成的三酰甘油酯就有六种异构体。例如：



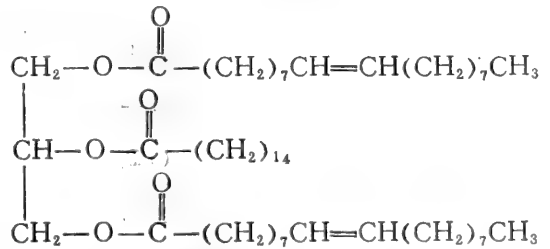
I 一油酰-1,2-二软脂酰甘油酯



II 一软脂酰-1,2-二油酰甘油酯



III 一油酰-1,3-二软脂酰甘油酯



IV 一软脂酰-1,3-二油酰甘油酯

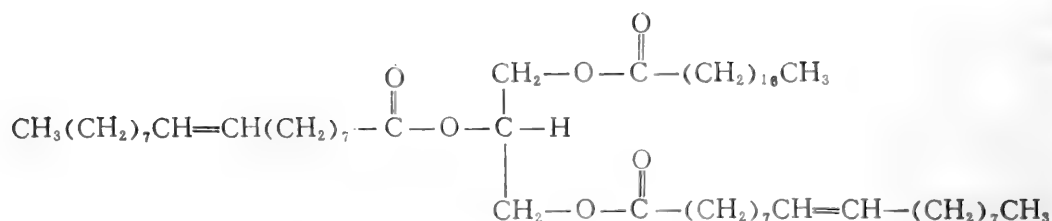
上式中 I 和 II 有旋光性，应各有两种旋光异构体。

此外还有三个脂酰都不同的三酰甘油酯。大多数天然脂类都是简单脂和混合脂的复杂混合物。

三、三酰甘油酯的理化性质

(一) 物理性质

三酰甘油不溶于水，但二酰甘油酯由于甘油分子中有一自由醇羟基，故可形成高分散的小微粒。三酰甘油酯的熔点因所含脂酰基的饱和度不同而异。动物中的三酰甘油酯饱和脂酰基含量高，熔点亦高；而植物中的三酰甘油酯不饱和脂酰基含量高，熔点较低。前者在室温下一般呈固态，俗称脂肪；后者在室温下一般呈液态，俗称为油。凡1,3一位脂酰基不同的三酰甘油酯都有旋光性，天然的一般都属 L-型。如：

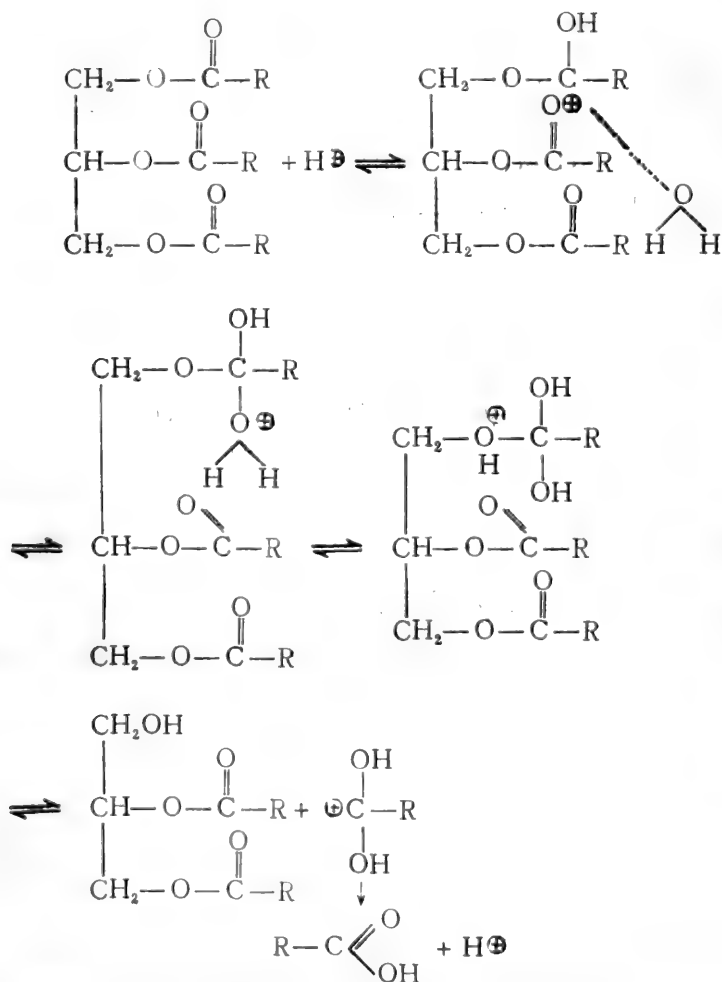


L-1,2-二油酰-3-硬脂酰-甘油酯

(二) 化学性质

1. 三酰甘油酯的水解反应

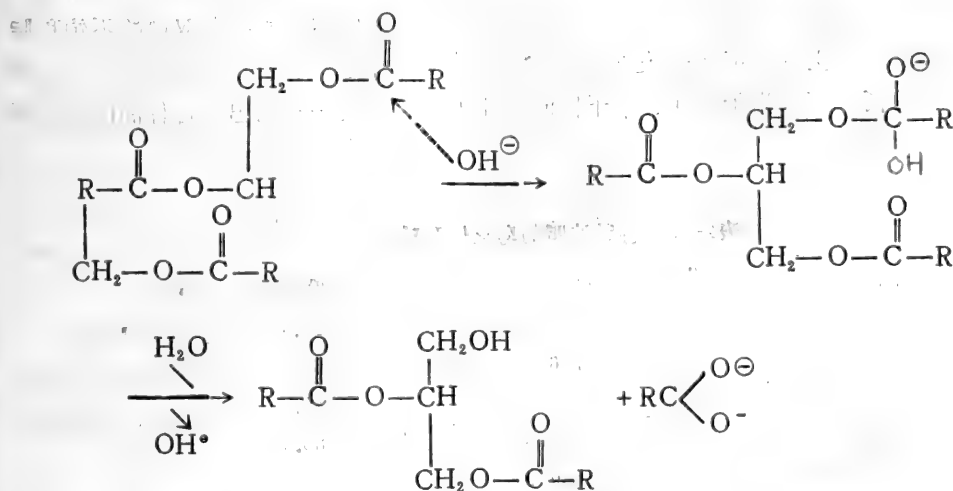
三酰甘油酯在酸、碱或脂肪酶催化下都可水解成甘油和相应的脂肪酸。酸水解机制首先是生成共轭酸中间物，然后再以不同机制断裂烷氧键或酰氧键而形成产物。最常见机制示如下式：



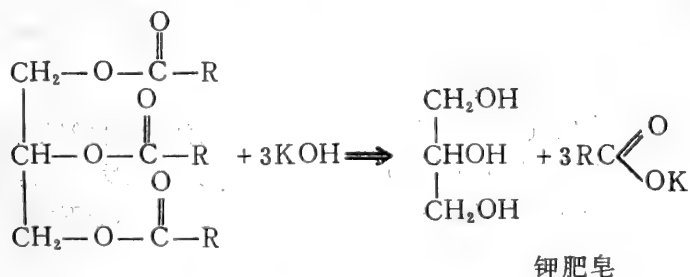
当三酰甘油酯的一个酯键被水解后，二酰甘油上的其它酰基可以向自由的甘油羟基转移

而成为各种二酰甘油酯的混合物。

碱催化酰基甘油酯的水解，首先经共轭碱中间物，然后再断裂，最常见的机制如下式：



在碱催化下，水解反应不可逆，可完全水解成脂肪酸盐。如果碱为 NaOH 或 KOH 则生成物为脂肪酸钠盐或钾盐。脂肪酸钠盐即日常所用的肥皂。所以脂类的碱水解反应一般称为皂化反应 (saponification reaction)。三酰甘油酯在 KOH 催化下完全水解的皂化反应可表示为：



从上式可以看出：要使一定量的各种三酰甘油水解，所需 KOH 的量是不同的。一般以水解一克油脂所需 KOH 的毫克数称为该油脂的皂化值 (saponification number)。油脂中脂酰基分子量越小，则每克油脂水解所需 KOH 的毫克数越大，即皂化值越大。所以测定油脂的皂化值，可以衡量一种油脂的平均分子量的大小。

$$\text{油脂的平均分子量} = \frac{3 \times 56 \times 1000}{\text{皂化值}}$$

2. 三酰甘油酯的氢化和卤化

由于油脂的三个脂酰基中有的是不饱和脂酰基，因而可与 H_2 和卤素等起加成反应。工业上常用 Ni 粉等催化氢化使液状的植物油适当氢化成固态三酰甘油酯，这称为人造奶油，

不饱和脂酰基的双键可与卤素起加成反应，通常用 I—Br 或 I—Cl 溶液与油脂等反应，以测定油脂中的不饱和程度。100克油能吸收碘的克数称为油脂的碘值 (Iodine number)。干性油如亚麻油、桐油含有大量多双键的不饱和脂酰基，其碘值高。这些多双键的不饱和脂肪酸三酰甘油酯，在空气中可经氧化聚合而成胶膜状化合物。所以这些油脂常称为干性油。植物油按其碘值高低可分为干性油、半干性油和非干性油。表2—3列出了各种油的皂化值和碘值。

油脂名称	皂化值	碘 值
猪 油	194.6	58.6
鱼肝油	186	165
牛 油	197	40.5
蓖麻油	180.3	85.5
亚麻油	190.3	178.7
玉米油	192.0	122.6
棉子油	194.2	105.7
桐 油	193.1	168.2
豆 油	190.6	130.2
向日葵油	188.7	125.5
麻 油	187.9	106.6
菜子油	174.6	98.6

上式所示过程中，烷基自由基的形成是碳氢键的均裂反应，这一均裂反应必需有引发剂诱导。某些金属离子可作为引发剂。在碱性溶液中从一适当的碳负离子，能形成烷基自由基，这是碳负离子在 O_2 的存在下进行单电子氧化作用的结果。烷基自由基一旦形成，即能进行几种类型的反应：它与分子氧反应生成过氧化物自由基，旋即与另一过氧化物自由基反应成为过氧化物和 O_2 ；或两个烷氧基和 O_2 。烷氧基可以吸收一个 H^\cdot 自由基成为醇，或进行均裂反应生成醛和一个烷基自由基。有些过氧化物自由基则从溶剂或另一碳氢链上吸引一个 H^\cdot 自由基而形成过氧化物和一个烷基自由基。实际上，这一氧化过程的生成物是一复杂的混合物，特别是当脂酰基具有多个双键时，引发可同时在多个部位发生，其生成物更为复杂。

4. 含羟基的酰基甘油酯的性质

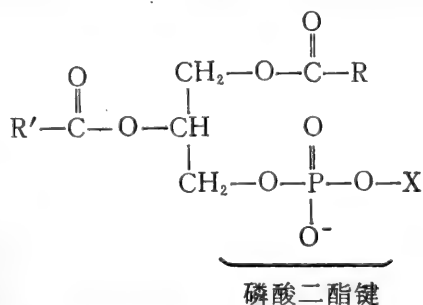
蓖麻油等含蓖麻酸，是含羟基的脂酰化合物，羟基含量可通过与乙酸酐或其它酰化剂反应生成乙酰化酯或相应的酰化酯而测得。中和一克乙酰化油脂所释放的乙酸所需 KOH 的毫克数称为乙酰化值 (acetylation number)，可用以衡量 $-OH$ 的含量。

第二节 磷酸甘油酯类

磷酸甘油酯类是磷脂中的主要部分，又称甘油醇磷脂。它们是生物膜的主要成分。

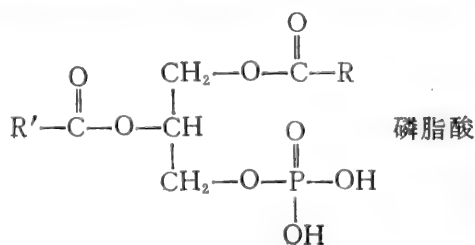
一、磷酸甘油酯类的通式和命名

磷酸甘油酯是甘油中的两个醇羟基与脂酰基成酯，而第三个醇羟基与磷酸成酯，磷酸再与含羟基的氮碱或其它含羟基的小分子化合物脱水形成磷酸二酯键，通式如下：

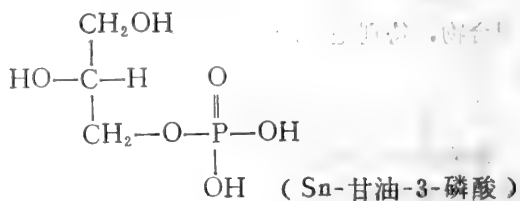
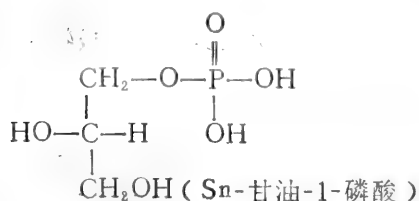


X 代表含羟基的氮碱或其它醇类衍生物。

上式中除去 $-\text{OX}$ 外的剩余部分称为磷脂酰基。磷脂酸的结构为：



生物体中的磷脂酸属 S_n -型或 $L-\alpha$ -型，这是从磷酸甘油的类型来命名的。1967年国际理论和应用化学联合会及国际生物化学联合会（IUPA—IUB）生物化学命名委员会所采用的命名法，其原则如下：甘油的一个醇羟基被磷酸酯化成磷酸甘油后，中间的碳原子即成为手性碳原子，把这个碳原子编号为 2。在投影式中，2 上面的碳原子编号为 1，2 下面的碳原子编号为 3。2 一位羟基写在左边，则这种构型就称为 S_n -型或 $L-\alpha$ -型。如



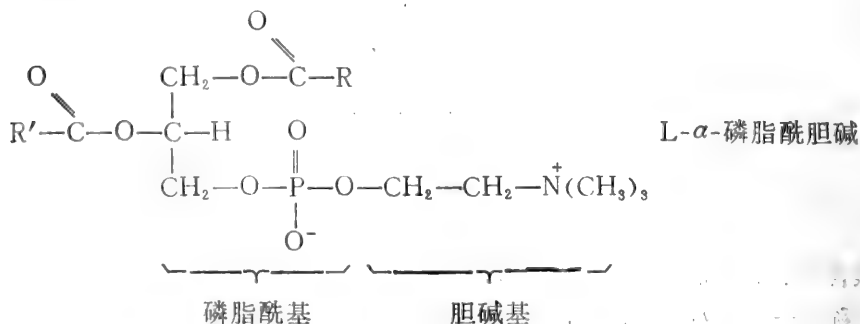
天然磷酸甘油酯中的磷酸甘油都属 S_n -甘油-3-磷酸类型或 L -型，有时写成 $L-\alpha$ -型是由于甘油的 1，3 碳原子都称 α -碳原子。

二、生物体中常见的几种甘油磷脂

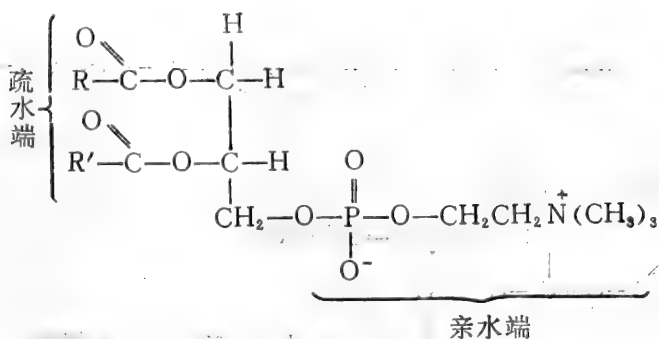
在生物体中，磷脂的功能是多种多样的，所以各种磷脂结构不同，功能也各异。

（一）磷脂酰胆碱（Phosphatidylcholines）

磷脂酰胆碱在卵黄中含量特别丰富，高达 8—10%，故名卵磷脂（Lecithin）。系统全名为 $L-\alpha$ -磷脂酰胆碱。其结构为：



卵磷脂分子中的脂酰基随来源不同而异。天然卵磷脂常常是含几种不同脂酰基卵磷脂的混合物。其中常见的脂酰基有软脂酰、硬脂酰、油酰、亚油酰、亚麻油酰和花生四烯酰基等。 α -位的脂酰基通常是饱和脂酰基，而 β -位的脂酰基则为不饱和脂酰基。卵磷脂呈两性离子（amphoteric ion）形式。如果把卵磷脂的结构式写成如下形式，则可看出该分子一端为非极性的疏水端，而另一端则为极性的亲水端。

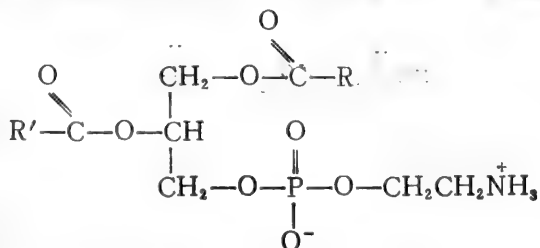


由于这类化合物一端亲水，一端疏水，因而称为单极性化合物 (amphipathic Compound)。就因为卵磷脂具有这一特性，使它成为生物膜结构中膜脂的主要成分，构成了膜双层。在膜中这些卵磷脂分子的疏水端处于膜的内部，不与外界水相接触；而亲水端则位于膜的外层，可暴露于外界的水介质中。膜结合蛋白也有单极性，其疏水部分与卵磷脂的疏水端在膜的内部结合，使膜蛋白镶嵌于流动的膜脂层中。

正因为卵磷脂有单极性性质，故它是血浆脂蛋白中磷脂的主要成分，成为载脂蛋白运输脂质和胆固醇等的得力助手。所以当人或动物体内甲基供体-S-腺苷甲硫氨酸缺乏时，体内胆碱合成不足，卵磷脂的合成减少，将会使三酰甘油酯转运困难而造成脂肪肝。临床常用胆碱或卵磷脂作为治疗脂肪肝的药物。

(二) 磷脂酰乙醇胺 (Phosphatidylethanolamine)

磷脂酰乙醇胺最初是在脑组织中发现的，故又名脑磷脂，其结构如下：



脑磷脂的伯胺基经甲基化即生成卵磷脂。从其结构可以看出其性质与卵磷脂相似。但卵磷脂中的胆碱其属季铵碱，碱性强。而磷脂酰乙醇胺中的乙醇胺基属伯胺，碱性弱。故卵磷脂可溶于乙醇和乙醚（疏水端所造成），而磷脂酰乙醇胺只溶于乙醚，不能溶于乙醇中。利用这一性质的差异可以把它们分开。

另外还有一种含氮甘油磷脂，称丝氨酸磷脂，其氮碱部分是一个丝氨酸代替了磷脂酰乙醇胺中的乙醇胺基。有时也把丝氨酸磷脂和磷脂酰乙醇胺一起称为脑磷脂。其性质与上述两种甘油醇磷脂相似。

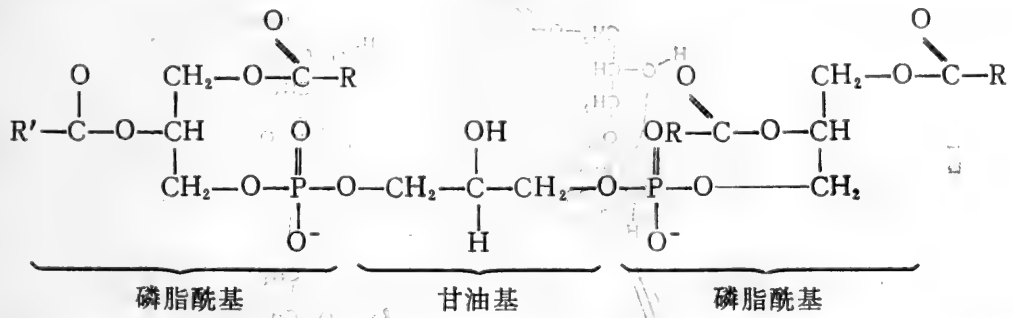
(三) 缩醛磷脂 (Plasmalogen 或 Acetalphosphatide)

缩醛磷脂的磷脂酰氮碱部分与上述卵磷脂或脑磷脂一样。而甘油上的两个羟基只有 β -位的羟基被脂酰化； α -位的羟基则不是被脂酰化，而可看作与一个烯醇羟基以醚键结合而成；也可看作是甘油的 α -OH 与一个脂肪醛经羟醛缩合后再脱水而成，缩醛磷脂的名称可能由此而得。

在磷脂酰肌醇中肌醇的 C-4 和 C-5 羟基 常被磷酸化成为4-磷酸磷脂酰肌醇或4,5-二磷酸磷脂酰肌醇。

磷脂酰肌醇和其它磷脂一起存在于生物体中，动物脑中最多，而且4-磷酸磷脂酰肌醇和4,5-二磷酸磷脂酰肌醇两种占一半以上。近年来已有许多实验证明：4,5-二磷酸磷脂酰肌醇的水解产物三磷酸肌醇象 cAMP 一样是生物体内许多钙联受体的第二信使。

(五)二磷脂酰甘油是由两个磷脂酰基各使一个甘油分子的1,3-位羟基酯化而成的。其结构如下式：



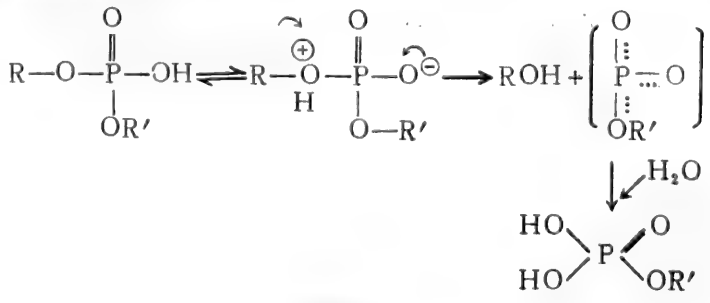
二磷脂酰甘油最初是从肝脏中分离获得的，故又名心磷脂。心磷脂存在于动物特别是人的线粒体膜中。线粒体膜分内外两层其干重30%为脂类，而膜脂中磷脂占90%，内膜含心磷脂很丰富。最近研究表明：心磷脂是唯一有抗原性的脂类，可应用于梅毒血清的疹断。在植物体中也有心磷脂存在，但其中一个甘油分子只有一个羟基与磷脂酰成酯，称为单磷脂酰甘油酯。

三、甘油磷脂的性质

甘油磷脂和三酰甘油一样，其酯键可被酸、碱、酶等催化水解。甘油磷脂中具有磷酸二酯键，在酸、碱、酶催化下亦可水解。关于酶所催化的水解反应见第十章磷脂代谢一节。这里只介绍一些酸、碱催化的水解反应机制。

(一)磷脂中磷酸二酯键的酸水解

一般来说二烷基磷酸二酯比一烷基磷酸酯和三烷基磷酸三酯难以在酸催化下水解。烷基磷酸的共轭酸，实际上是以100%的烷氧断裂形式水解。不解离的形式则以70—80%的 烷氧断裂形式水解，其它则以 P—O 断裂形式水解。烷氧断裂方式的水解与三酰甘油中的烷氧断裂方式相同。磷氧断裂方式如下式：



如果在磷酸二酯键的邻近有一邻位羟基，则其酸水解反应更复杂。在此情况下可产生环磷酸酯。在磷脂分子中，甘油 C-2 上如果已经脱酰并产生自由羟基，则其水解情况示如图 2—1。

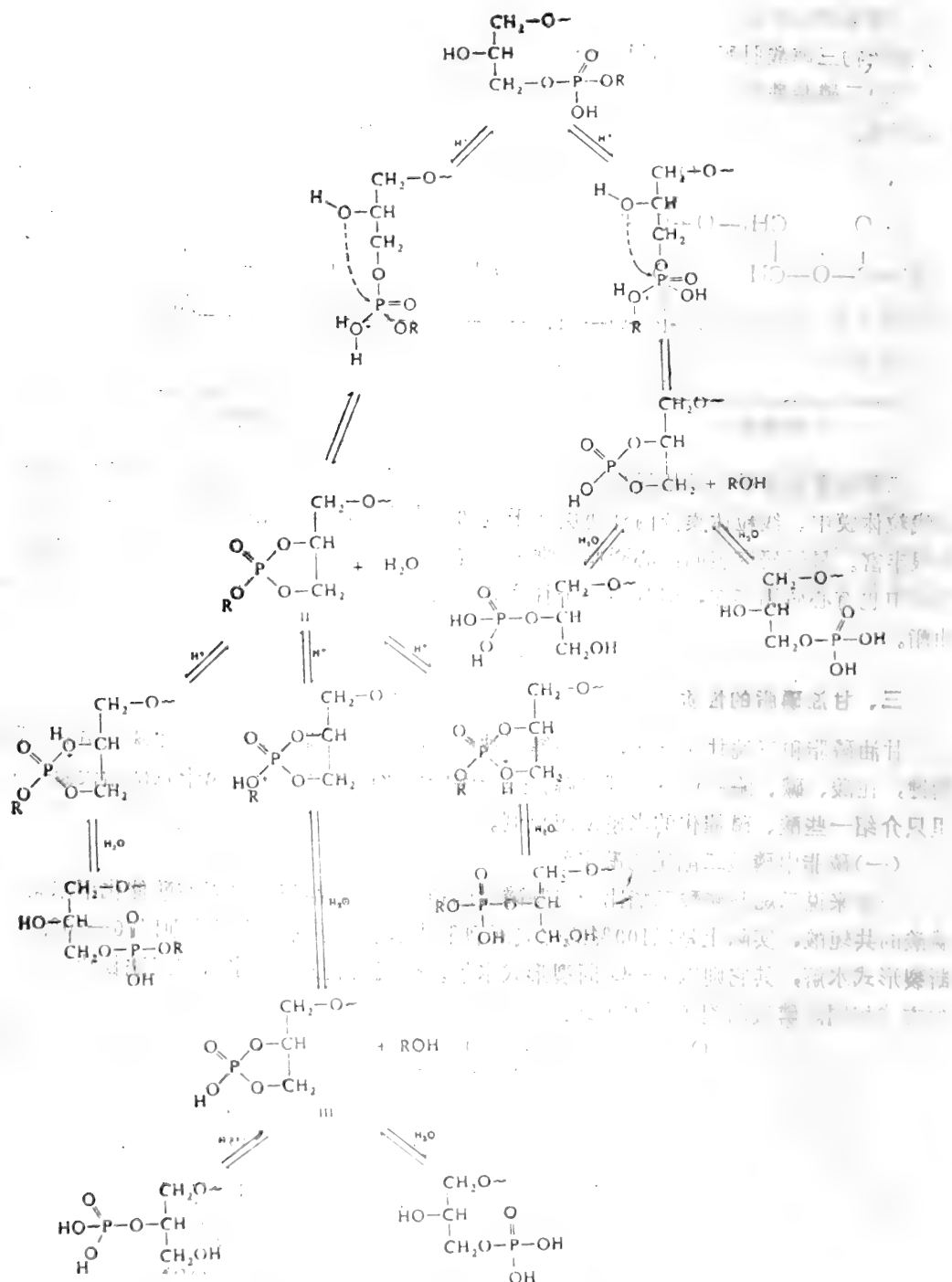


图2—1 有 C-2-OH 存在下的磷脂的酸水解过程

(二) 磷脂中磷酸二酯键的碱水解

在一般情况下二烷基磷酸二酯在碱性溶液中不易水解。因为在碱性溶液中二烷基磷酸酯的磷酸根负离子与 OH^- 相互排斥。但如果在磷酸二酯键邻位有一羟基，则由于碱的作用使邻位羟基亲核攻击磷原子而形成环磷酸酯中间物。例如甘油部分已脱酰的磷脂酸肌醇在碱性溶液中进行的水解反应随 OH^- 亲核攻击时离去的基团不同，而呈三种不同机制。

1. 机制 A：因甘油负离子被排斥离去而形成一种环磷酸酯。如图2—2。

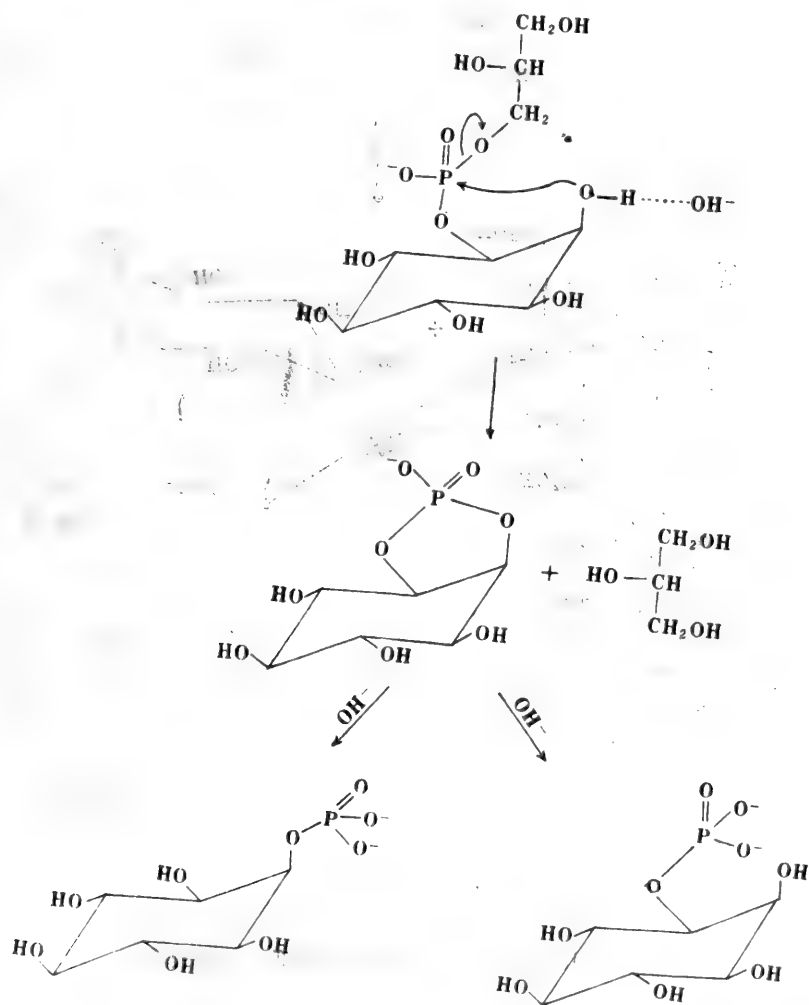


图2—2 具有邻位羟基的磷酸二酯键的碱水解历程 A

2. 机制 B: 由于肌醇负离子被排斥离去而形成环磷酸酯。如图2—3。

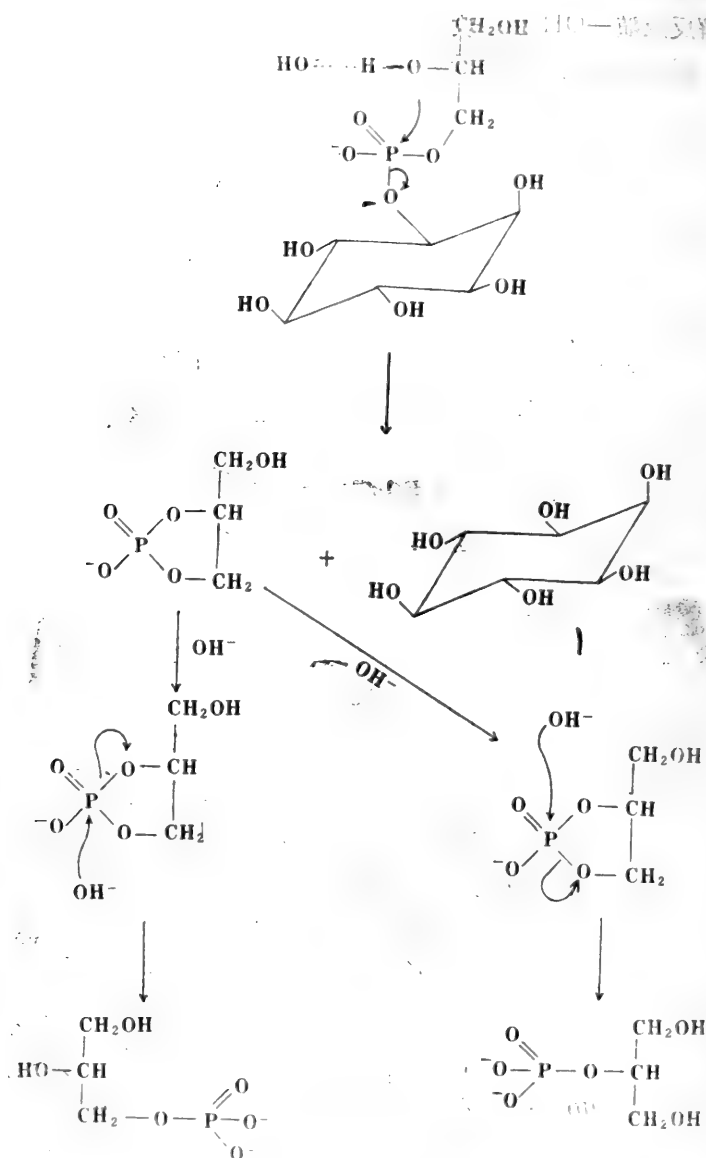


图2—3 具有邻位羟基的磷酸二酯键的水解历程 B

3. 机制 C: 由于羟基的亲核攻击排斥肌醇磷酸负离子使之离去, 而形成环氧化合物。如图2—4。

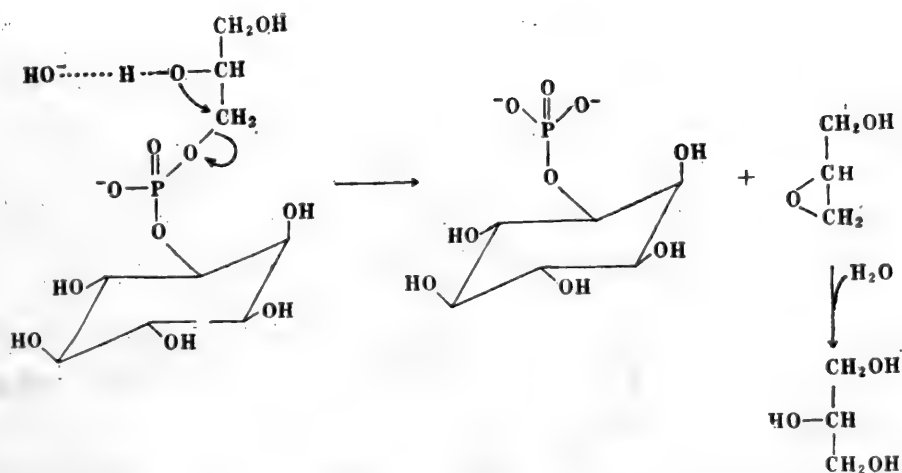
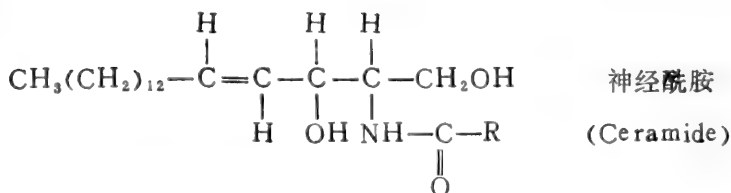
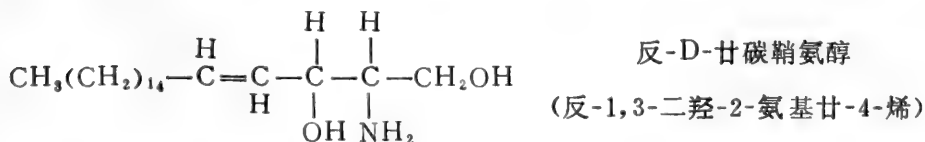
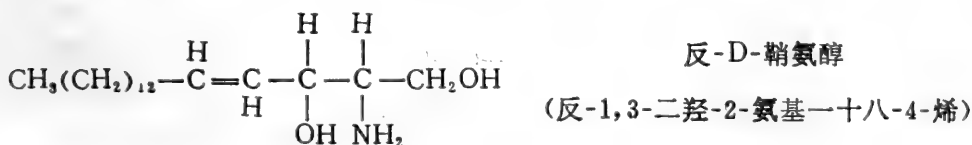


图2-4 具有邻位羟基的磷酸二酯键的碱水解历程 C

一般来说形成环磷酸酯比形成环氧化合物中间物更有利。两种环磷酸酯又倾向于按机制 A 进行，因为甘油负离子为伯醇负离子，它比肌醇的仲醇负离子碱性弱，易于被排斥。环氧化合物之所以形成主要是由于肌醇-1-磷酸负离子是一个较易离去的基团。

第三节 鞘磷脂类

不含甘油而含鞘氨醇的磷脂统称为鞘磷脂。鞘磷脂的脂酰基，不是由脂肪酸与鞘氨醇的醇羟基脱水而成酯键，而是由脂肪酸与鞘氨醇的氨基脱水而成酰胺键。故又称为 N-酰基鞘氨醇，或神经酰胺。



神经酰胺被磷酸胆碱磷酸化则形成鞘磷脂(Sphingomyelin)。结构如下式



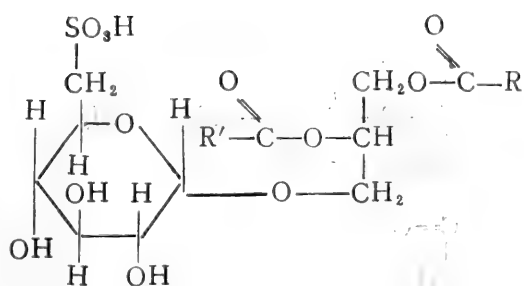
鞘磷脂也属单极性化合物，一端为鞘氨醇的长碳氢链和脂酰基的长碳氢链，另一端则为磷脂酰胆碱的两性离子（在 pH7）。

則、 $\frac{1}{2} \times 100 = 50$ 點

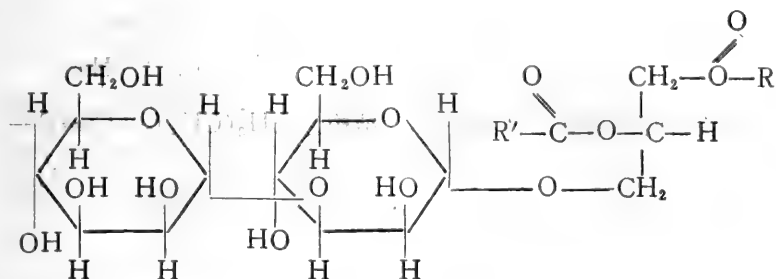
一、甘油醇糖脂(glycosyl acylglycerol)

 β -半乳糖二酰甘油

46



磺基-6-脱氧葡萄糖二酰甘油，
存在于植物叶绿体中



α -甘露二糖二酰甘油

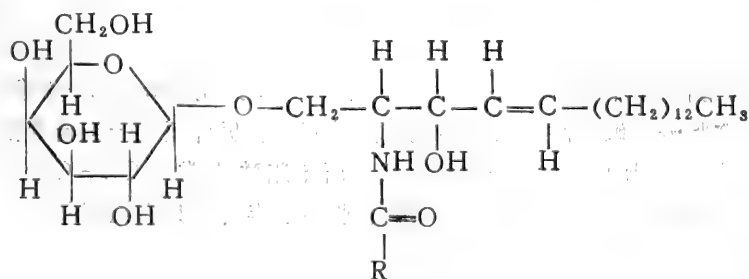
甘油醇糖脂多存在于高等植物中，脊椎动物神经组织中也含有，如 β -半乳糖二酰甘油。

二、鞘糖脂 (glycosphingolipid)

鞘糖脂比甘油醇糖脂更为重要。生物体内的鞘糖脂可分为三类。

(一) 中性单糖基鞘糖脂或单糖基脑糖脂 (cerebroside)

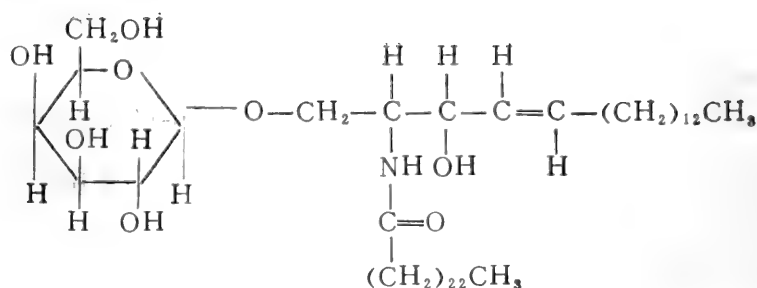
在脑糖脂分子中含有一个神经酰胺，以其 C-1 羟基与一单糖分子 (半乳糖、葡萄糖等) 以糖苷键结合，结构通式如下 (这里的糖苷基为半乳糖苷基)：



根据脑糖脂中所含酰基不同又分为如下几个亚类

1. 角苷脂 (kerasine)

角苷脂一般含 C_{23} 、 C_{24} 、 C_{25} 等饱和脂酰基，其中以廿四酰为主。例如

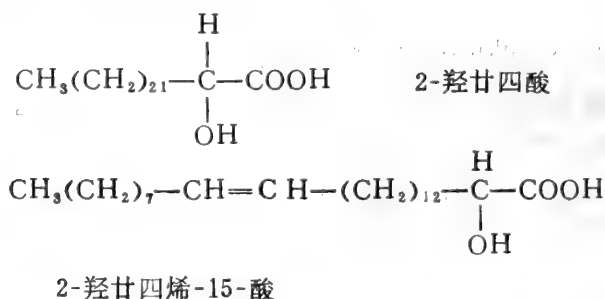


2. 烯脑苷脂 (nervone)

烯脑苷脂又称神经苷脂。主要含廿四烯酸 (神经酸), 结构为 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7 - \underset{\text{H}}{\overset{\text{H}}{\text{C}}} = \underset{\text{H}}{\text{C}} - (\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$ 。有时也含 C_{25} 和 C_{26} 烯酸。

3. 羟脑苷脂

羟脑苷脂因其可含有饱和的或不饱和的脂酰基而分为两类, 一类含2-羟廿四酰基, 另一类含2-羟廿四烯-15-酰基。两种脂肪酸的结构式如下。



在中枢神经的脑苷脂中有时半乳糖的 C-3 或 C-6 或鞘氨醇的 C-3 羟基也被酰化, 这些酰基通常为软脂酰、硬脂酰、软脂油酰或油酰基等。另外还有一类脑苷脂, 其半乳糖的 C-3 羟基被 H_2SO_4 所酯化, 称为脑硫酸脂。其中所含脂酰基常为 $\text{C}_{22} - \text{C}_{26}$, 且以2-羟廿四酰为最普遍, 这种脑苷脂在脑白质的半乳糖脑苷脂中很丰富, 其它组织亦含有之。

(二) 寡糖基鞘糖脂或寡糖基脑苷脂

寡糖基鞘糖脂或寡糖基脑苷脂, 所含糖组分不象上面列举的鞘糖脂那样含单糖, 而是含由两个、三个或四个单糖结合而成的寡糖。这些鞘糖脂存在于生物膜组分中。人红细胞膜的主要鞘糖脂结构如图2-5。

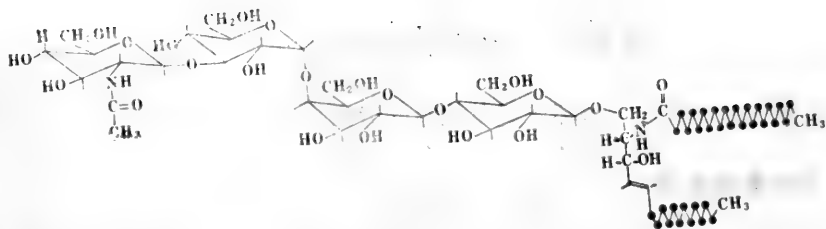


图2-5 人红细胞膜的鞘糖脂结构

(三)神经节苷脂 (ganglioside)

神经节苷脂由神经酰胺与一复杂寡糖结合而成。寡糖中也包括 N-乙酰或 N-羟乙酰神经氨酸。神经节糖脂存在于大脑灰质中，为细胞膜的一个组分。这些脑糖脂也存在于脾脏、肾脏和其它器官中。有一种神经节糖脂结构如图2—6。此神经节糖脂的寡糖中只有一个唾液酸残基，称为单唾液酸神经节糖脂。此外还有一些神经节糖脂含有两分子或三分子唾液酸。

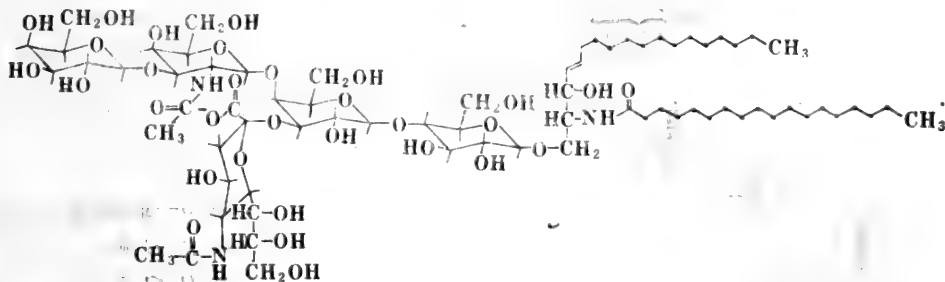


图2—6 一种神经节糖脂的结构

三、糖脂的性质及功能

糖脂与磷脂、相比，以糖基作为极性端取代磷脂中的磷酰胆碱，因而它也是单极性分子。在细胞膜中，糖脂的非极性脂酰基端伸入膜双层中，而极性的糖链则伸出细胞膜外表面。膜糖脂已证明可作为细胞表面的可溶性调节分子的受体。在糖脂中，寡糖残基中的特殊序列已证明能识别霍乱毒素、干扰素、巨噬细胞移动抑制因子和甲状腺激素等。各种细菌性肠毒素受体，在性质上也属糖脂类。糖脂也构成仙台病毒、病毒性风疹病毒和细菌性噬菌体等各种病毒颗粒的细胞表面受体。带有 A、B、H 专一性的红球膜抗原，属鞘糖脂类，能与适当血清抗体结合。在调节某种细胞的社交性，如组织专一性种类和细胞间的配对反应等时，糖脂也起重要作用。邻近细胞表面糖脂的专一性识别和粘附，可能是细菌、酵母细胞和单细胞有机体间配对所必需的前奏（这种相互作用也包含糖蛋白）。

上面所介绍的脂类化合物都属于脂肪酸的衍生物，多数是脂肪酸酯。另外还有一些脂类化合物不属于脂肪酸酯，只有以有机溶剂提取时它们才与以上脂类一起被提取出，在生物体内它们又常与以上脂类共存。

第五节 甾类化合物 (Steroids)

甾类化合物又称类固醇，是环戊烷多氢菲的衍生物。

一、类固醇骨架结构

甾类化合物是由三个六元环和一个五元环拼合而成的稠环系统。如下式中 A、B、C 为三个六元环，D 为五元环。A、B、C 拼合成的环称多氢菲。在类固醇分子中，每个环之间拼合时可采取顺式或反式。如 A、B 环的拼合采取顺式构型时，称为正系构型；而采取反式构型时称为别系构型 (allo-series configuration)。天然存在的类固醇，其 B、C 和 C、D 之间的拼合采取反式构型。然而在植物糖苷中的类固醇组分，其 C、D 之间的拼合则采取顺式构型。一些正系和别系类固醇结构如图 2-7。

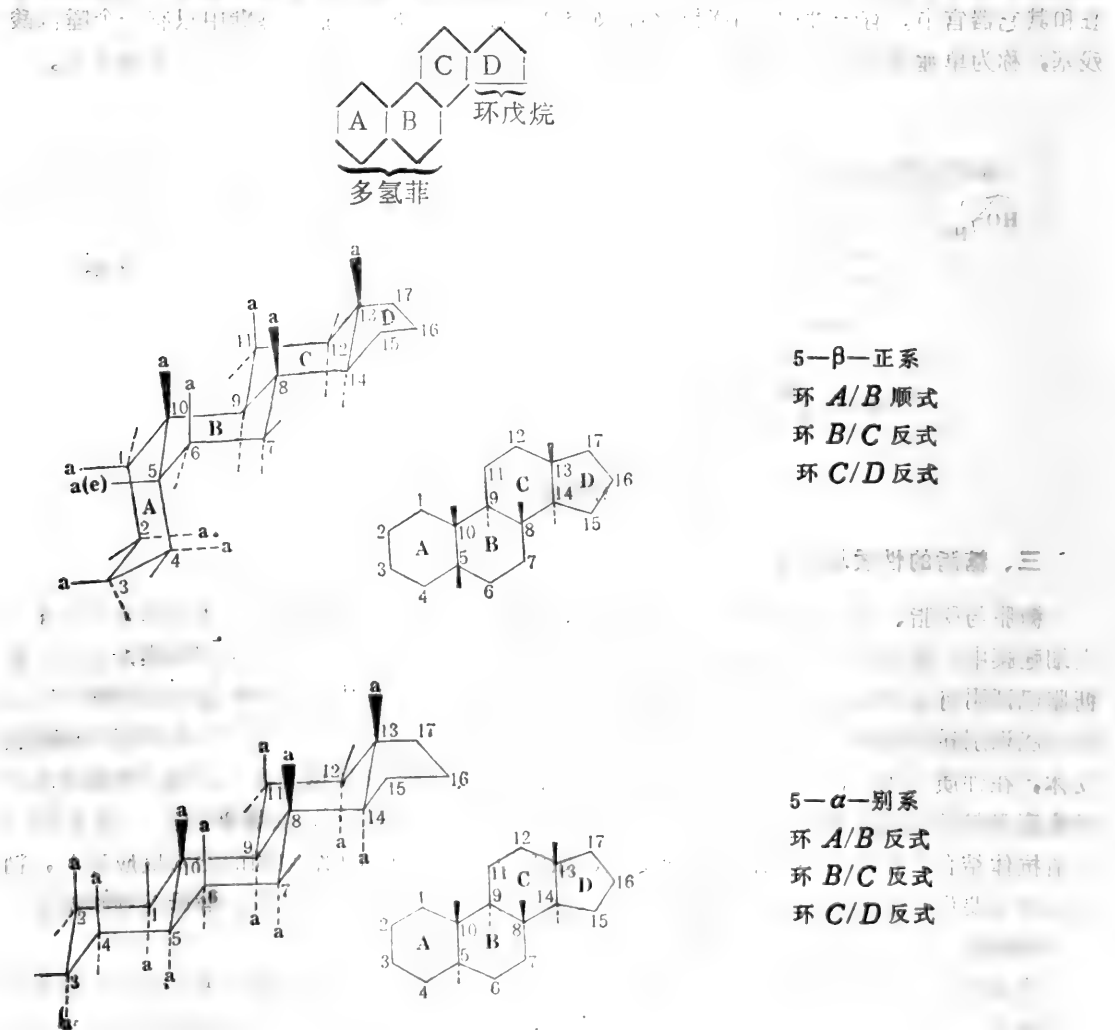


图2-7 正系和别系类固醇结构实例

天然类固醇常以一定母核衍生物命名，如饱和类固醇则以胆甾烷 (cholestane)、孕甾烷 (Pregnane)、雌甾烷 (estrane)、雄甾烷 (andostane) 等衍生物命名。不饱和类固醇则以不饱和碳氢母核命名。如雌甾-1, 3, 5-三烯、雄甾-1, 4-二烯或孕甾-1, 4-二烯等。虽然所有饱和六元环都是椅式构象 (图2-7)，但引入不饱和键后，六元环变成半椅式构象

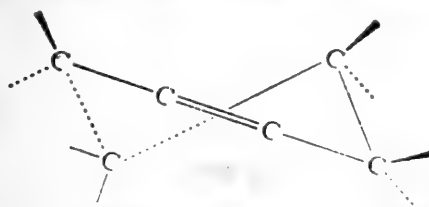


图2-8 六元环半椅式构象图

象，在半椅式构象中，以双键相连的两个碳原子和其邻位的两个碳原子位于同一平面内，另两个碳原子则一个在该平面上方，另一个在该平面下方如图2-8。轴向键取代物可伸向环平面上方或下方。当伸向上方时习惯以楔形键 \blacktriangledown 表示。这样的取代物称 β -取代物。而当取代物伸向平面下方时习惯以虚线表示，这种取代物称 α -取代物。

二、类固醇化合物的结构特点

(1) 母核第3位几乎都带有一OH。

(2) 角甲基18和19一位碳原子绝大多数结合在 C-10和 C-13上，但有些雄性激素例外，其角甲基连在轴向键上而伸向平面上方。

(3) 在母核17一位上结合着一个长链脂肪烃基。这取代基习惯上常作为类固醇分类的标准。

三、固醇类 (Sterols)

(一) 动物固醇 (Zoosterol)

凡是母核3一位有一OH，17一位的侧链带8-10个碳原子的类固醇通称固醇或甾醇。动物组织中含有最丰富的是胆固醇，其结构如图2-9。

几乎所有动物脂类样品及血液和胆汁中都含固醇。血液中有2/3的胆固醇被脂肪酸所酯化成胆固醇酯，其余则以游离状态存在。胆固醇中的脂肪酸，大多为不饱和脂肪酸。胆固醇的5, 6双键处被还原，结果得两种产物，如图2-10的粪甾醇和胆甾醇。

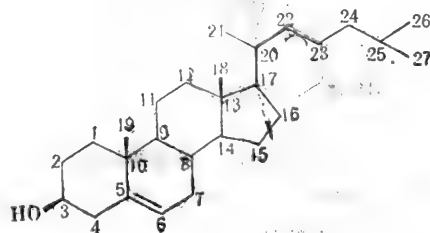


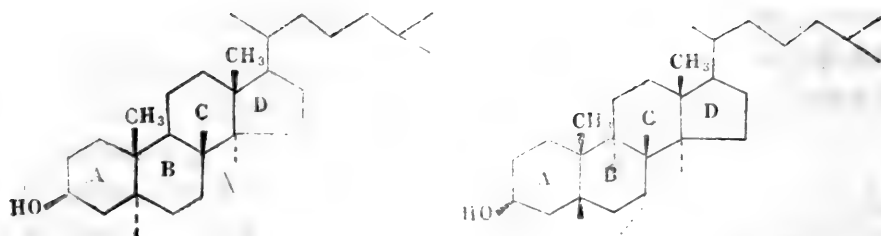
图2-9 胆固醇结构

这两种胆甾醇不同之处，在于 A、B 环拼合时构型不同，前者为 β -正系，后者为 β -别系构型。粪甾醇是粪便中存在的主要固醇，而胆甾醇是存在于血液和其他动物组织中的少量固醇。

在动物皮肤中有胆固醇的氧化产物—7-脱氢胆固醇。它存在于皮下，在紫外光照射下可形成维生素 D₃ (反应见第五章维生素)。

在动物机体中胆固醇还可转变为多种固醇激素 (见激素一章)。

胆固醇与毛地黄皂苷在乙醇溶液中反应可生成沉淀，此反应可用于胆固醇的定量测定。

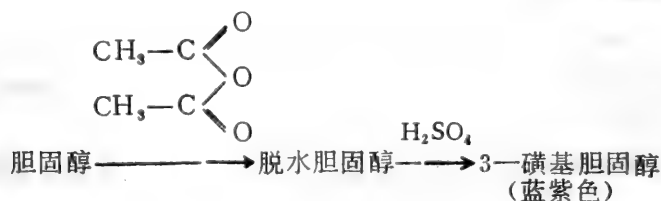


粪甾醇[β, 正系构型]

胆甾烷醇[β-别系构型]

图2-10 胆固醇还原产物结构

在 CHCl_3 溶液中胆固醇与乙酸酐和浓 H_2SO_4 作用产生蓝绿色。根据此反应可用比色法测定胆固醇含量。其它在环中有双键的固醇都有类似的反应。反应过程为：



(二)植物固醇(Phytosterol)

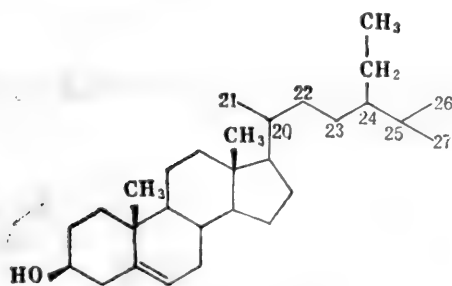


图2-11 谷固醇结构

植物固醇存在于植物细胞中，它们彼此的差异有些是环上双键位置不同，有些是17一位侧链取代基不同或双键有无不同。禾谷类中的谷固醇结构如图2-11。大豆中的豆固醇与谷固醇相似，只是 $\text{C}_{22}-\text{C}_{23}$ 之间为一双键。一般植物固醇比动物固醇在17-位上的侧链多1—2个碳原子，如谷固醇即在胆固醇的 C_{24} 上由一个 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 取代了一个氢原子，多了两个碳原子。而油菜固醇则在胆固醇

醇 C_{24} 上被 $-\text{CH}_3$ 取代，多了一个碳原子。

(三)菌类固醇

存在于酵母及真菌中的固醇以麦角固醇含量最丰富。它在紫外线照射下可转变成维生素 D_2 ，在结构上比胆固醇环7-8-位多一个双键，17-位侧链 C_{24} 有一 $-\text{CH}_3$ 取代，其结构及转变为维生素 D_2 的反应见第五章维生素。

(四)其它类固醇化合物

生物体内类固醇化合物很多，其中有重要意义者如下：

1. 胆汁酸

从人胆汁中可分离出四种不同的胆汁酸，即胆酸、脱氧胆酸、鹅脱氧胆酸和石胆酸。在

肝中胆固醇经羟化、环双键饱和化、C-3差向异构化和17-位侧链部位降解等步骤，即可生成胆酸、鹅脱氧胆酸、脱氧胆酸和石胆酸。其详细反应见第十章固醇代谢。

分泌到汁中的胆汁酸实际上是上述各种胆汁酸的羧基和甘氨酸、牛磺酸 ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$) 中的 $-\text{NH}_2$ 脱水结合而成的酰胺类化合物，称为甘氨胆酸和牛磺胆酸。它们的结构如图2-12。

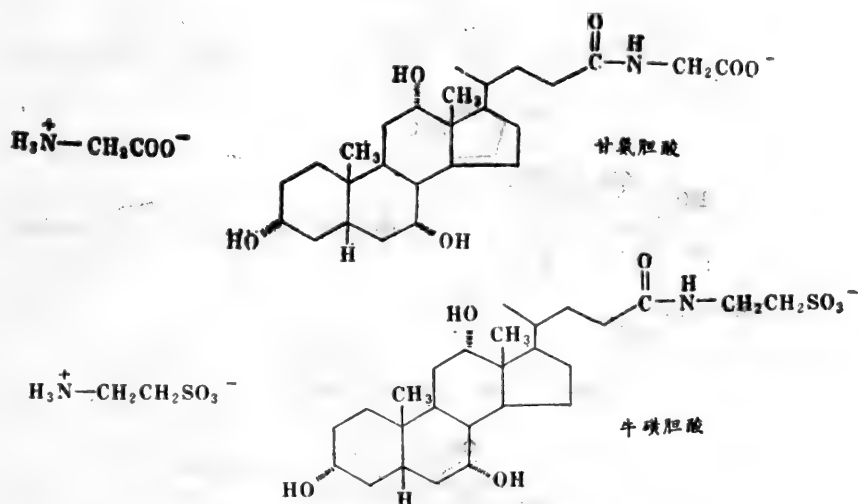


图2-12 甘氨胆酸和牛磺胆酸的结构式

胆汁中各种胆汁酸的存在是胆汁苦味的来源。胆汁酸盐是一种乳化剂，能使肠腔内的油脂乳化，并能激活消化液中的脂肪酶，促进脂类物质的消化。另外，鹅脱氧胆酸盐能使胆固醇溶解。因而可用作治疗胆石症的口服药，它也能部分地抑制胆固醇的形成。

(二) 强心苷(Cardiac glycoside)

许多植物如夹竹桃科、玄参科、百合科、毛茛科中的黄花夹竹桃、毛地黄、毛旋花子、海葱等都含有一种强心糖苷。这种糖苷是由寡糖和类固醇配基结合而成，是寡糖的苷羟基和类固醇 C-3-OH 脱水结合而成的糖苷。这类固醇配基是整个糖苷分子中的药物学活性部分，可使心肌的收缩加强，结果增加心脏输出，降低静脉血压。也可用它治疗多尿症，但剂量过大会中毒。强心苷的配基往往包含第五个环，即五环内酯和六环内酯，图2-13是一些强心苷类固醇配基的结构。

类固醇皂苷是在结构上类似强心苷的植物性糖苷。也是由类固醇配基和寡糖以糖苷键结合而成。除一般类固醇的四个环外，它还有两个另加环。毛地黄皂苷结构如图2-14。

皂苷在水中起泡，可作为油在水中的乳化剂，因此可作去污剂。毛地黄皂苷类固醇可与胆固醇及其它 $3-\beta\text{-OH}$ 固醇形成不溶性复合物，可用作分析试剂以测定这些类固醇。

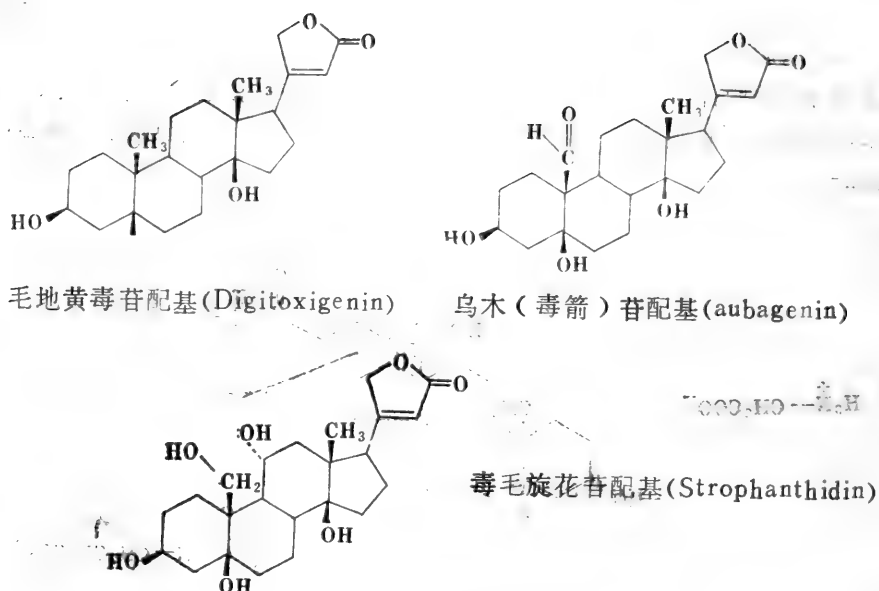


图2-13 各种强心苷配基的结构

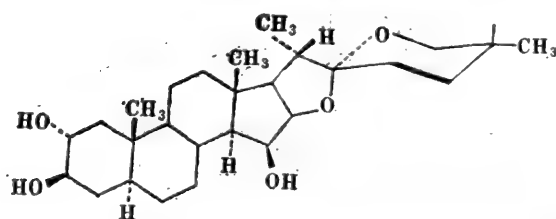


图2-14 毛地黄皂苷配基(Digitogenin) 结构式

第六节 前列腺素

在人精液及前列腺分泌液中含有一种有生物活性的脂类物质，它是长链多烯脂肪酸经环化和氧化而产生的类脂肪酸衍生物。由于最早是从人精液和羊前列腺中提取此物的，所以称为前列腺素。前列腺素是环状含氧，具有20个碳原子的脂肪酸，可认为是前列腺酸的各种衍生物。前列腺酸的结构如下式：



前列腺素按分子中功能基和饱和程度不同分为几类。

母体前列腺素称为 E 系前列腺素(PGE)，其结构特征是 C—9 为酮基，C—11 和 C—15 各带一个羟基，如图2—15。前列腺素 F 系的结构特征是 PGE C—9 酮基为—OH 所取代，如图2—15。PGE 的 C—11 羟基在 pH5—8 可起消去反应得 PGA。PGA 经双键重排得 PGB(图2—15)。

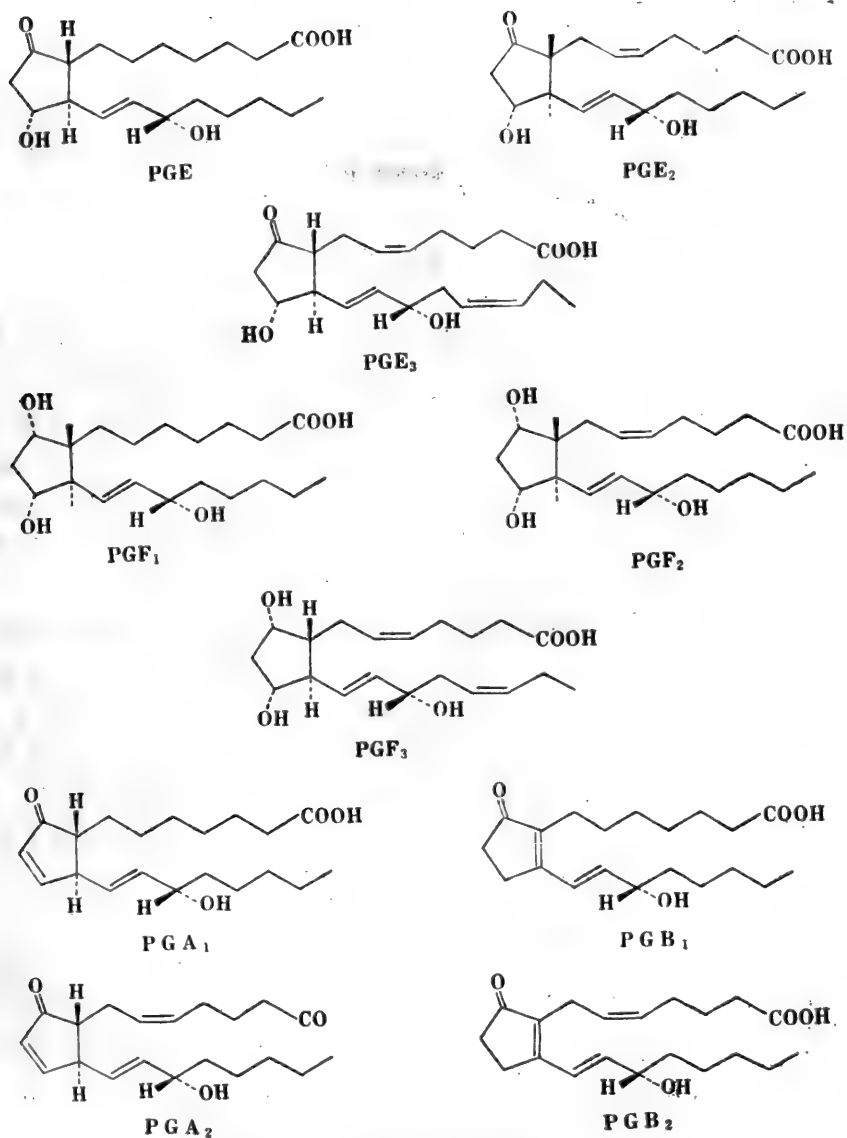


图2-15 各种前列腺素的结构

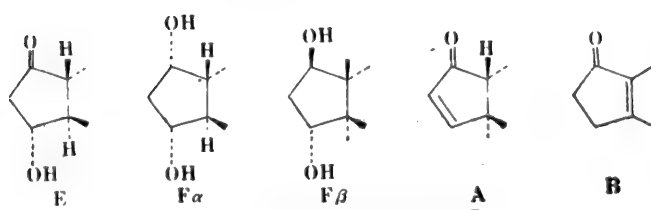


图2-16 各种前列腺素的结构差异

四种前列腺素结构差异可示如图2-16、图2-15中 F_{α} 、 F_{β} 、 A 、 B 等后面的注脚字母1、2、3代表它们的双键数目及位置同 E 系。

前列腺素的功能是多种多样的，最初认为它们能调节平滑肌的收缩与松弛，并有降血压作用，又能引起分娩及流产。近年来发现它们可以通过对其它激素的作用而影响脂肪的水解。它们对血小板的凝聚和胃液的分泌等有抑制作用。

第七节 脂 蛋 白

由于大部分脂类实际上不溶于水，因而它们在血浆中的运输是与专一性蛋白质相结合而完成的。实际上在血浆中没有哪一种脂类不是与蛋白质相结合的。这些脂蛋白运输系统为组织提供脂类物质（主要是三酰甘油）以用于氧化放能或形成贮脂。这些蛋白质约有20%在肠粘膜上制造，80%在肝中形成。脂蛋白中紧密结合的脂类分子和多肽之间不存在共价键。血浆脂蛋白所运载的脂类除磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺等极性脂和三酰甘油等非极性脂外，还有胆固醇及其酯。非极性的三酰甘油和胆固醇隐藏在内部，多肽链的亲水部分和甘油磷脂分子的亲水头部构成一水溶性外壳，如图2-17。

血浆在高速离心时，脂蛋白则根据其漂浮常数和密度不同而分开。按脂蛋白密度的不同分为四种不同组分，即极低密度脂蛋白(VLDL)、低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL)和极高密度脂蛋白(VHDL)等。每个组分含有一种以上的载脂蛋白。根据电镜观察，分离的脂蛋白组分呈球形，密度愈高的组分其球形直径愈小。一些载脂蛋白的氨基酸序列已经弄清。 $apo-C I$ 、 $apoC II$ 和 $apo-C III$ 各含57、95和97个氨基酸残基； $apoA I$ 含245个氨基酸残基； $apoA II$ 则是由含77个氨基酸残基的两个相等亚基通过二硫键连结而成的二聚体。入血浆中各种脂蛋白的特征示如表2-4。

表2-4 各种血浆脂蛋白的特征

性质	VLDL	LDL	HDL	VHDL
密度	0.95-1.006	1.006-1.063	1.063-1.210	>1.21
直径(Å)	300-750	200-250	100-150	100
漂浮常数 S_0	12-400	0.12		
电泳组分	β	β	α	α
mg 数/100ml 血浆	130-200	210-400	50-130	290-400
近似组成(%)				
蛋白质	9	21	33	57
磷 脂	18	22	29	21
胆固醇	7	8	7	8
胆固醇酯	15	38	23	14
三酰甘油	50	10	8	5
自由脂肪酸	1	1	—	—
脱辅基蛋白				
主要成分	B、CI、CII、CIII	B	AI、AII	AI、AII
次要成分	AI、AII、D		CI、CII、CIII、D、E	
载脂特征	主要是三酰甘油、磷脂酰胆碱和鞘磷脂等含磷组分	高胆固醇亚麻酸酯	高磷脂酰胆碱和胆固醇亚麻酸酯	

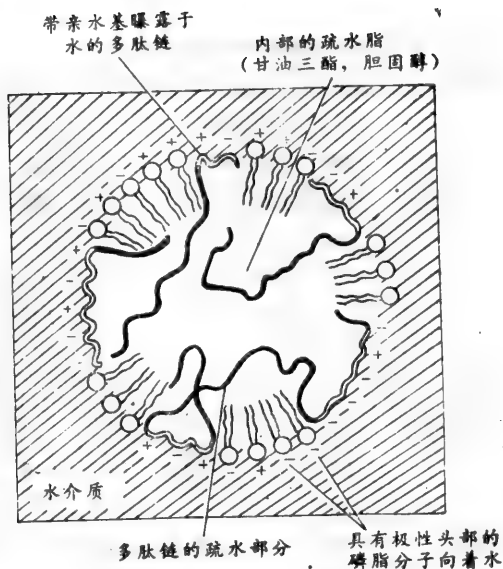


图2-17 血浆脂蛋白载脂图

第八节 类脂和生物膜

一、生物膜的种类和组成

所有活细胞都由70—100 Å的细胞膜包围着。此外真核细胞具有一系列专门化的细胞内细胞器，每种细胞器也都是由膜包起来使之彼此隔开的。如细胞核有核膜，线粒体有线粒体膜；叶绿体有类囊体膜等，此外还有溶酶体膜、高尔基体膜、内质网膜等。虽然这些膜成分的结构和功能各异，但它们都含有单极性脂类。由于膜的种类不同，脂类含量可在20%—80%之间变化，其余主要为蛋白质。动物细胞膜中脂类和蛋白质含量之比一般为1:1；但线粒体内膜只含20%脂类，蛋白质约为80%；相反脑髓膜含有80%的脂类而只有20%的蛋白质。天然膜除脂类和蛋白质外，还有少量糖类(小于10%)与蛋白或脂类共价结合。

膜中的脂类成分主要有三大类，它们的含量次序如下：磷脂、类固醇及其酯、糖脂。膜磷脂包含磷脂酰胆碱(P.C)、磷脂酰乙醇胺(P.E)、磷脂酰丝氨酸(P.S)、磷脂酰甘油(P.G)、磷脂酰肌醇，此外还有缩醛磷脂和鞘磷脂等。膜糖脂中，甘油糖脂广布于细菌和植物中，动物中极少，但精液中的一种糖脂(Semino Lipid)—1—O—软脂酰—2—O—软脂酰—3—β—D—(3'-磺基)—半乳糖—Sn 甘油，是唯一例外，它存在于动物睾丸和精子中。神经节苷脂和鞘糖脂普遍存在于动物细胞膜中，在植物及微生物中则含量稀少。表2-5是一些膜的脂类成分

近年来已利用各种生物膜在脂质上的相似性来判断细胞器的亲缘关系。例如鼠肝和牛肝中核膜鞘磷脂的含量 = 粗内质网膜 < 高尔基体膜 < 细胞质膜、这意味着在生物起源过程中是先形成粗内质网再形成高尔基体最后生成质膜，因为鞘磷脂是在膜合成后才合成，所以从鞘

表2—5 各种膜的膜脂含量及脂类成分

膜的来源	脂类干重	胆固醇	P.C	S.M	P.E	P.I	P.S	P.G	糖脂
鼠 肝									
细胞膜	30—50%	20	64		17	11		2	
内质网膜(粗)	15—30%	6	55	3	16	8	3	—	
内质网膜(光滑)	60%	10	55	12	21	6.7			
线粒体内膜	20—25%	<3	45	2.5	25	6	1	2	
线粒体外膜	30—40%	<5	50	5	23	13	2	2.5	
核膜	15—40%								
高尔基体膜	60%								
溶酶体膜	20—25%	1	37		35			18	痕量
牛心线粒体膜		23	17	16	16	0.8	8		痕量
人红细胞膜									
鼠红细胞膜	40%	24	31	8.5	15	2.2	7		9
鼠脑突触体	50%	20	24	3.5	20	2	8		
鼠脑髓	60—70%	22	11	6	14		7		21
半脑髓		22	10	8	15	1	9		28
大肠杆菌细胞膜	20—30%	0	—	12	72			16	
叶绿体膜	20—30%	0	4			1.5		6	55

磷脂的含量，可以判断各细胞器形成的先后次序。又如线粒体膜和细菌细胞膜的二磷脂酰甘油的高含量，已作为证明线粒体是从共生细菌进化而起源的证据。

各种膜脂除了在组成上有不同外，其脂酰基的种类也显示很大差异。现已证明许多膜脂的脂酰基不是随机的。各种脂酰基的分布具有品种、组织、细胞器、代谢状态等高度特色。例如：

(1)绝大多数生物膜脂其脂酰基都是偶数碳原子，虽然在自然界也存在奇数碳的脂酰基，但在膜磷脂中其含量几乎不会超过2%。

(2)枝链和环状脂酰基在膜磷脂中很稀有，但含环丙烷的脂酰基链存在于大肠杆菌等细胞膜中。

(3)在膜脂中不饱和脂酰基的不饱和程度可以多到六个双键，但以18:1、18:2、18:3和18:4等不饱和脂酰基为主，其总量占总不饱和脂酰基量的90%以上。

(4)饱和与不饱和脂酰基的比例，从一种膜到另一种膜变化很大。如细胞膜脂含有高比例的饱和脂酰基，而线粒体膜则具有较高比例的不饱和脂酰基。

生物膜的蛋白质构成膜总量的20—80%。如红细胞膜含20%的蛋白质，而线粒体内膜则蛋白质含量高得多。在膜中有些蛋白质是酶；其它一些蛋白质则起着结合和运输极性分子的作用，使它们能穿过膜。各种膜蛋白在膜上的结合位置及状态是不同的。有些松弛地结合于膜表面，称为膜外周蛋白或表在蛋白(Peripheral或extrinsic Protein)。另一些膜蛋白则埋入膜结构内部，甚至完全伸展而通过膜，这些蛋白称为膜的本体蛋白或内在蛋白(integral or intrinsic protein)，前者易于从膜上提取出来，而后者只有用去污剂或有机溶剂才能提

出。

膜中的糖以寡糖链共价结合于蛋白上,形成糖蛋白,有少量的糖以共价结合于鞘磷脂上形成糖脂。存在于糖蛋白和糖脂中的糖主要有半乳糖、甘露糖、岩藻糖、N-乙酰氨基半乳糖、N-乙酰氨基葡萄糖、葡萄糖、唾液酸等。后者通常作为末端残基,所有哺乳类细胞所带的负电荷,常由此而来。糖蛋白中的糖常连结到一个门各酰胺的氮原子,或丝氨酸和苏氨酸的羟基上(见第一章)。糖脂则为 N-酰基神经鞘氨醇的衍生物。图2—5、2—6所示二例即为两种膜糖脂。

二、生物膜的结构

生物膜主要靠脂类与脂类间以及蛋白质与脂类间的疏水相互作用来维持其稳定性。对各种生物膜的物理测量,特别是小角 X-射线衍射分析表明:大量的膜磷脂排列成脂双层,这样的脂双层提供了膜的结构骨架。核磁共振、电子自旋共振等物理技术所观察到的磷脂双层中的每个脂类分子的运动情况显示:脂双层表现为二维流体状,脂双层中的脂类分子快速地与单层内的邻近分子交换位置(约 10^8 次/秒),但内外两层间的脂分子交换位置(flip-flop)则很慢,半月才交换一次。这是由于进行这种交换必需把极性头部带经双层的碳氢尾巴,需要消耗极高的活化能。每个磷脂分子在膜双层内部不是刚性的。脂双层中磷脂的快速侧向扩散,实际上部分是由于脂酰链的快速热运动,推动分子间的碰撞所造成的。这些碰撞本身又是由于围绕脂酰链中的C—C键快速旋转而造成的。其旋转程度以靠近链末端的最大,而在极性头部基团附近的则最小。

脂双层在给定温度下的流动性决定于其组成。只由一种磷脂组成的双层显示急剧地、特等地从液体状态转变为六方晶格的相变。这样的胶状相流动性很小,显示很小的侧向扩散。相变温度(T_m)决定于磷脂头部基团的本质和脂酰链的长度和不饱和程度。由于脂酰链绕C—C键旋转的速度越向末端越增加,因此链越短越具柔性,从而赋予膜高度的流动性。当脂酰链中存在顺式双键时,会引入扭曲于该链中,干扰晶格中链的紧密堆砌,这也会造成膜流动性的增加。因此链越短,不饱和程度愈高, T_m 愈低。在脂双层中含有混合磷脂时,则在较广的温度范围内有一个连续的相变。这意味着有一个胶囊和液体的相分离产生。

通过细胞具有专一性机制来保持它们脂双层处于流动状态,即保持在 T_m 以下,可充分说明一个流动双层对膜功能的重要性。在细菌中,膜脂酰基的组成,随生长温度的改变而改变,以便使膜保持流动状态。在真核中,胆固醇起此专一性作用,当胆固醇引入脂双层中时,类固醇环平面与最近的极性基团头部的脂酰链的那些区域相互作用,并部分地使该区域固定化,而使链的其余部分有柔性,并阻止它们(甚至在低温时)结晶成所需的六面体的紧密堆砌。同时,胆固醇减少脂酰链的运动性,并增加双层内部的微粘性(microviscosity)。相反,合成胆固醇的前体羊毛固醇对膜的流动性只有一临界影响。其差异原因是羊毛固醇的甲基使它在空间不易与脂酰链相互作用。羊毛固醇在 C_{14} 上的 α -甲基突出,并由类固醇环系的平面下侧伸出,阻止与脂酰链的有效接触。

埋于膜脂双层中的蛋白质象脂双层一样显亦其动力学性质。即由于它们溶于一个二维流体中,使其侧向扩散很快。同样也不会交换内外两层分子间的位置,这种交换比磷脂还要慢。内在蛋白直接嵌入脂类双层,与脂类相互作用。疏水表面被脂双层的碳氢尾巴溶剂化,

而极性表面则被 H_2O 溶剂化（如图2-18）。表在蛋白不埋入脂双层，而是只通过它与膜上内在蛋白的相互作用，而结合于膜上（图2-18），它常溶于水中。内在蛋白疏水表面一般是由于疏水氨基酸群集而产生疏水区或疏水穴，这疏水穴与脂双层的碳氢尾巴相互作用。在有些例子中疏水表面的形成是因为存在高含量疏水氨基酸，这样的蛋白质的疏水性可能非常强，但却能溶于非极性有机溶剂，它们又常称为蛋白脂质。有一种蛋白脂质称为(Lipophilin)，是脑髓磷脂的主要膜蛋白，其氨基酸有66%是疏水的。此外它约含二克分子脂肪酸，以酯键与每克分子肽中的丝氨酸或苏氨酸结合。虽其确切功能尚不了解，但蛋白脂可在离子通道中作为线粒体 ATP 合成的媒介，或能调节离子进入膜运送部位。

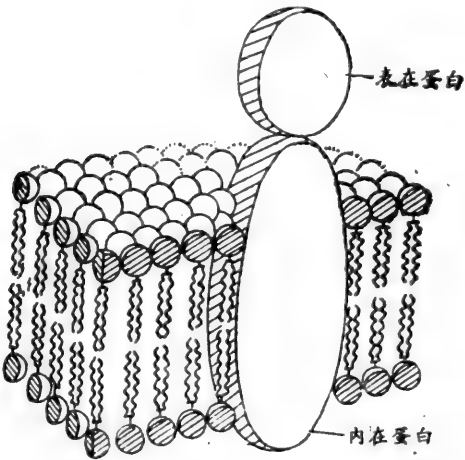


图2-18 在膜中的表在蛋白与内在蛋白及其与膜脂的关系

许多，或许是所有内在蛋白横跨膜脂双层的整个宽度，膜两侧都有氨基酸序列暴露。基于膜的脂质和膜蛋白的一些特性，有人提出了生物膜的流动镶嵌模型，如图2-19。该

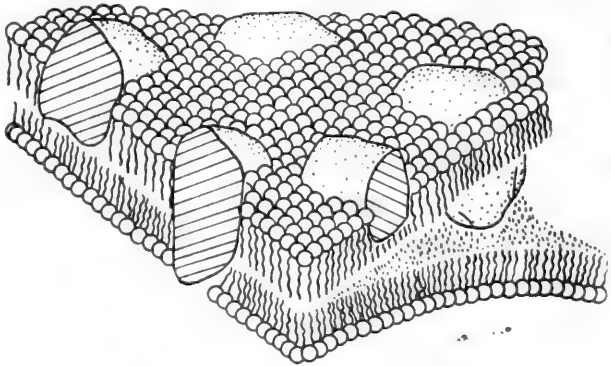


图2-19 生物膜的流动镶嵌模型

模型认为：膜结构的连续部分是极性双层，其在常温下是流动的，膜内在蛋白的疏水表面溶入脂双层中心的疏水部分。膜的表在蛋白含亲水基团，它们结合于膜双层的头部，处于膜双层的外表面。内在蛋白包括酶和运输蛋白，它们一般是不活泼的，当它们进入双层尾巴内

部，并在那里产生适当三维结构时，才有活性。即外周蛋白好象侧向浮游于脂双层海洋的表面，而内在蛋白就象流水完全浸没在脂质碳氢尾巴之中，这个模型已得到了上述一些物理方法的证实。这个模型也能解释生物膜的许多物理、化学和生物学特性，它作为较可取的膜脂和膜蛋白的分子排列模型已为大家所接受。

三、一个生物膜结构的实例—红细胞膜

人红细胞膜已得到了较详细的研究。它含有五种主要蛋白质和许多稀有蛋白质。大部分蛋白质是糖蛋白。在其内在蛋白中有一种血型糖蛋白(glycophorin)，它是含130个氨基酸的肽和由许多糖残基构成的MN血型糖蛋白分子。在肽链的一端是复杂的亲水头部，由约15%的寡糖分枝构成，每个分枝约10个单糖单位。肽链的另一端有许多谷氨酸和门冬氨酸残基。在pH7时带负电荷。两个亲水端之间是一个30个疏水氨基酸序列。带糖的那一端位于红细胞膜的外表面，形成毛刷状伸出部位。疏水的中间区是行经脂双层的部分。带负电荷的高极性端则伸入胞液中。MN血型糖蛋白的富糖头部含血型抗原，它对有机体的血型(A、B、O)是专一的。它也含有一些致病病毒的接触部位。

红细胞链的另一主要蛋白是红细胞内的蛋白(Spectrin)，又称红膜肽(Tekin)，是红细胞膜内表面的表在蛋白，它构成总膜蛋白的20%。它由四条肽链构成，形成约100—200nm长的柔性棒，结合在膜内表面的专一性蛋白和脂类分子上，在其内表面上形成柔性棒网络，起着膜骨架结构的作用。与红膜肽结合的还有类肌动蛋白的微丝，这些微丝似乎是把红膜肽棒结合在一起，这样使红细胞膜具有网架结构，允许专一性的膜脂和膜蛋白“停泊”在那里。

除红细胞膜外，有些其它类型的细胞膜具有更复杂的结构，在许多固体组织细胞的外表面上，所存在的其它主要膜糖蛋白是纤维结合素(fibronectin)，它具有高粘附性，它的主要功能是使固态组织中的同类细胞间发生粘连。

四、生物膜的复杂功能

现已证明生物膜不单是贮存细胞或细胞器等的情性皮层，也不是静止地固定不变的构架，它执行着许多复杂的多变功能和呈现很显著的生物学性质。大部分膜含有酶，有些酶作用于膜外底物，而另一些酶则作用于膜内的内含底物。线粒体内膜和叶绿体类囊体膜含有许多酶和蛋白质的复杂系统。大部分膜含有运输系统，它们转运某种专一的有机营养物质，如葡萄糖，或把一些特殊无机物和某种产物运入其中。这些运输系统有助于调节通过细胞内外物质的流量。而保持细胞内部的稳态持久性。膜上也含有带电的表面基团，有助于维持跨膜的电位。这种特性对神经细胞是很重要的，神经细胞能很快传递脉冲，该脉冲就是沿着伸展的细胞体或轴突膜电性质的波形变化而转递的。细胞膜也有自身焊接作用，一旦被机械地刺穿或破裂，它们会很快自动修复伤口。

在细胞膜的外表面上含有专一性的识别部位，有对某种分子信号起识别作用的区域。例如一些细菌膜能感知培养基浓度的细微差异，刺激它们向营养成分来源的方向泳动，这种性质称为趋化性(chemotaxis)。动物细胞膜的外表面含有识别同种其它细胞的识别部位，在组织结构的有序发育期间促进细胞的结合。细胞表面上的另一种识别部位可作为激素分子的专一性受体，例如肝和肌肉的细胞表面含有识别胰岛素、高血糖素和肾上腺素等激素的部

位，一旦它们被这些激素结合，这些激素受体部位就把信号经膜而传递到细胞内的酶系统，以调节它们的活性。在细胞表面还有其它部位称组织相容性部位，它是一个品种的给定个体所特有的。

在动物细胞膜上的许多专一性识别部位或受体部位中，神经节苷脂似乎是其重要成分。神经节苷脂虽然在膜上含量很低，是膜脂的稀有组分，但在特殊部位上，它们似乎是被浓缩而存在。神经节苷脂有许多不同类型，每一类具有一个不同的寡糖头部基团，不同的神经节苷脂象不同的糖蛋白一样被排列成不同的特殊镶嵌图形，以构成细胞表面不同种类的受体部位。它们的极性带负电的头部基团，可作为受体或“天线”从膜表面伸出，对某种讯号分子呈现敏感性。

因此细胞膜是高度复杂的结构物质，在其上许多不同种类的分子集合体，以有序的二维镶嵌图形排列着，这样的排列图形使其表面产生特有的生物学专一性。细胞膜的分子模式（molecular architecture）是近代细胞生物学和生物化学中最重要的研究课题之一。

第三章 蛋 白 质

第一节 蛋白质概述

一、蛋白质是生物体内最重要的物质

蛋白质 (Protein) 是生物体内的最重要的物质之一, 不论是高等动物、植物、还是简单的细菌、病毒等都有蛋白质存在。它是细胞原生质的主要成分, 与核酸一起共同构成了生命现象的物质基础。蛋白质的重要性很早就被认识, 是生物化学研究的重要对象, 并且从一开始人们就注意到它在生物体的作用。1838年, 当 G. J. Mulder 提出蛋白质这个名词时, 他就明确指出: 在植物和动物中存在这样一种物质, 毫不怀疑它是生物体中已知的最重要的物质, 如果没有它, 在我们这个地球上生命则是不可能存在的。这种物质被称为蛋白质。

当人们认识到催化生物体内的(几乎)一切化学反应的酶, 调节物质代谢的许多激素, 以及使人和动物具有防御疾病、抵抗外界病原侵害的抗体等都是蛋白质或多肽后, 蛋白质在生物体内的重要性则是不言而喻了。象肌肉收缩、结缔保护、病毒对宿主的感染等都是蛋白质在其中起作用。随着生物化学和分子生物学的发展, 使人们不断认识到诸如胚胎发育、生长、分化和繁殖等都有蛋白质参与作用并受到蛋白质的控制和影响。甚至一种生物的性状也由它自身产生的各种不同的蛋白质相互作用所表现出来的总的结果。

二、蛋白质的元素组成

蛋白质是含氮的有机化合物, 其含氮量占生物组织中一切含氮物质的绝大部分。氮元素是蛋白质区别于糖和脂肪的特征性元素, 而且根据对大多数蛋白质的氮元素的分析, 其氮元素的含量都相当接近, 一般在 15—17%, 平均为 16%, 即 100 克蛋白质中含有 16 克氮。因此, 在蛋白质的定量分析中, 每测定 1 克氮即相当于 6.25 克的蛋白质。

测定含氮量通常采用凯氏微量定氮法。蛋白质样品先经浓硫酸加热消化, 使蛋白质中的有机氮转变成成为无机氮, 然后碱化蒸馏, 放出的氨气用标准酸吸收, 再以标准碱滴定剩余的酸或用标准酸回滴定至原来的酸浓度, 计算出含氮量, 再乘以 6.25 即可求出该样品中的蛋白质含量。

蛋白质除含有氮元素外, 还含有下述几种主要元素:

C: 50—55%;	H: 6.0—7.0%;
O: 20—23%;	S: 0.3—2.5%.

有些蛋白质含有少量的磷, 还有些蛋白质含有微量的金属元素, 例如铁、铜、锰、锌等。

三、蛋白质的基本组成单位是氨基酸

在生物界,构成生物机体的蛋白质种类很多,根据估计,约有 10^{10} — 10^{12} 种。蛋白质分子都很大,一般分子量在10,000以上,最小的也有好几千。它们在结构上很复杂。但是,它们都可以被酸、碱以及各种水解蛋白质的酶等催化水解,使蛋白质分子断裂,分子量逐渐变小,水解成分子量大小不等的肽段和氨基酸。肽(peptide)是两个或两个以上的氨基酸组成的片段。随着水解的进行,肽段可以进一步水解成氨基酸,而氨基酸则是不能再水解的更小的单位。因此,我们说氨基酸是蛋白质水解的最终产物,是组成蛋白质的基本单位。

用各种方法水解蛋白质,通过分析,确知组成蛋白质的氨基酸有20种。这些氨基酸借助肽键(见后述)彼此连接在一起。因此,蛋白质就是由各种氨基酸通过肽键连接而成的、具有特定结构的生物大分子。由于氨基酸种类多,而且连接的顺序又各不相同,在此基础上形成的空间结构也不相同,因而就构成了蛋白质种类多样、功能各异的基础。

四、蛋白质的分类

蛋白质可以按不同的方法分类。作为分类的依据主要有:①分子的形状或空间构象;②分子的溶解性质;③分子的组成情况;④功能。

按照分子的形状或空间构象的不同,可将蛋白质分为纤维状蛋白和球状蛋白两大类。纤维状蛋白分子很不对称,形状类似纤维。有的纤维状蛋白能溶于水,例如肌肉的结构蛋白和血纤维蛋白原;有的纤维状蛋白不溶于水,如角蛋白、丝心蛋白以及胶原蛋白等。球状蛋白质分子的形状接近球形,空间构象比纤维状蛋白复杂。球状蛋白质的溶解性较好,能结晶,生物体内蛋白质大多数属于这一类。

根据分子组成情况,可将蛋白质划分为单纯蛋白和结合蛋白两类。单纯蛋白不含有非蛋白质部分。这类蛋白质水解后的最终产物只有氨基酸。单纯蛋白质按其溶解性质的不同可分为白蛋白(或清蛋白)、球蛋白、谷蛋白、醇溶蛋白、精蛋白、组蛋白以及硬蛋白等。

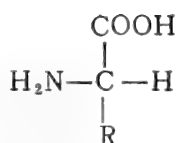
结合蛋白是指由单纯蛋白和非蛋白成分结合而成的一类蛋白质,包括核蛋白、色蛋白、磷蛋白、糖蛋白和脂蛋白等。

如果按照蛋白质的功能,则可划分为酶蛋白、结构蛋白、运输蛋白、受体蛋白、调节蛋白、防御蛋白、贮存蛋白、毒蛋白等等。

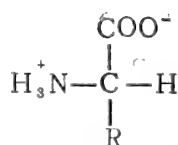
上述蛋白质的分类并不是绝对的,彼此间是有联系的。例如组蛋白属于单纯蛋白,若它和DNA结合在一起时,则把它们合称为核蛋白,是属于结合蛋白类。

第二节 氨基酸

从蛋白质的水解产物中分离出来的约20种氨基酸,经结构分析,发现除脯氨酸外,这些天然氨基酸在结构上都有一个共同点,即在与羧基相连的 α -碳原子上含有一个氨基,故把这些氨基酸统称为 α -氨基酸(α -Amino acid)。 α -氨基酸的结构通式是:



或



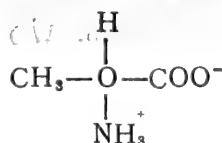
一、氨基酸的结构及其分类

从上面的结构通式中我们可以看出，组成蛋白质的20种氨基酸，它们之间的差别表现在R基团上，即是说，不同的氨基酸有不同的R基团。这种差别导致一种氨基酸区别于它种氨基酸。后面我们将会看到，正是由于这些不同的R基团在决定蛋白质的结构、性质和功能方面起重要的作用。这些R基团通常叫做侧链基团或侧链R基团。

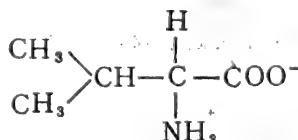
基于氨基酸结构上的差别，可以根据其侧链R基团的结构不同进行分类。既然侧链基团在结构上存在差别，那么必然在其性质上也存在差别。在这里，我们将按照各种氨基酸侧链R基团的极性差别进行分类。这对于认识蛋白质的性质、结构与功能更为有利。按照这种分类方法可将氨基酸分为四大类，即非极性的或疏水性的侧链R基氨基酸；中性的或无电荷的极性侧链R基氨基酸，带正电荷的或碱性的极性侧链R基氨基酸，以及带负电荷的或酸性的极性侧链R基氨基酸。注意，这些氨基酸的解离条件是指在细胞生理pH范围内。

1. 非极性侧链R基氨基酸

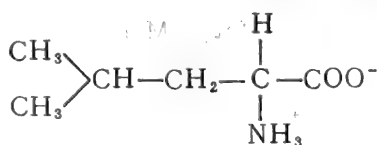
丙氨酸 (α -氨基丙酸*)
(Alanine, Ala., A**)



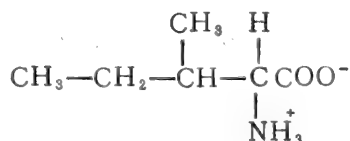
缬氨酸 (α -氨基异戊酸)
(Valine, Val., V)



亮氨酸 (α -氨基异己酸)
(Leucine, Leu., L)



异亮氨酸 (α -氨基- β -甲基戊酸)
(Isoleucine, Ile., I)

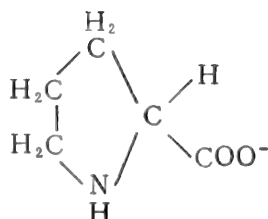


以上四种氨基酸的R基团为脂肪族烃基。

*: 氨基酸的化学名称。

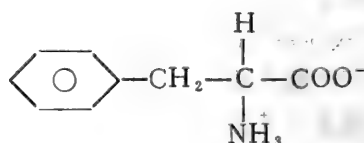
**.: 前面的是氨基酸的英文名称，中间的是缩写符号，后面的是单字符号。

脯氨酸(四氢吡咯-2-羧酸)
(Proline, Pro., P)

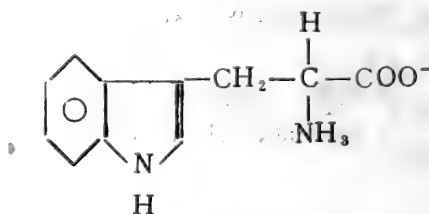


脯氨酸是一种 α -亚氨基酸, 其侧链 R 基团为一杂环结构, 由侧链基团和 α -氮原子相连而成。因此, 脯氨酸与其他19种氨基酸不同, 它含有一个亚氨基(>NH)而不含氨基($-\text{NH}_2$)。

苯丙氨酸(α -氨基- β -苯基丙酸)
(Phenylalanine, Phe., F)

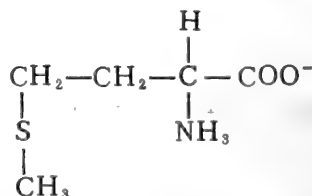


色氨酸(α -氨基- β -吲哚基丙酸)
(Tryptophan, Trp, W)



这是两种芳香族氨基酸。

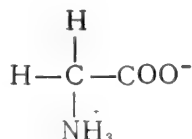
甲硫氨酸(α -氨基- γ -甲基丁酸)
(Methionine, Met., M)



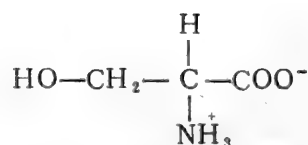
以上八种氨基酸由于侧链脂肪烃基的疏水作用, 故在水中的溶解度比极性侧链 R 基氨基酸小。在这八种氨基酸当中丙氨酸的侧链脂肪烃基最小, 其 R 基团的疏水性也最小。

2. 无电荷的极性侧链 R 基氨基酸

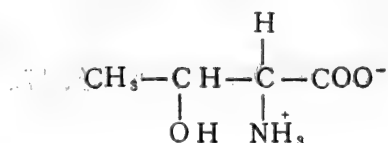
甘氨酸(α -氨基乙酸)
(Glycine, Gly., G)



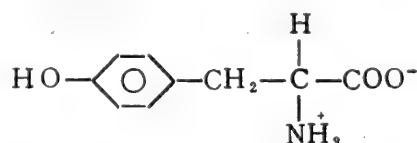
丝氨酸 (α -氨基- β -羟基丙酸)
(Serine, Ser., S)



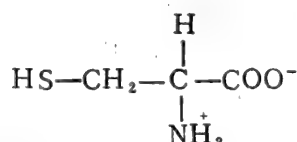
苏氨酸 (α -氨基- β -羟基丁酸)
(Threonine, Thr., T)



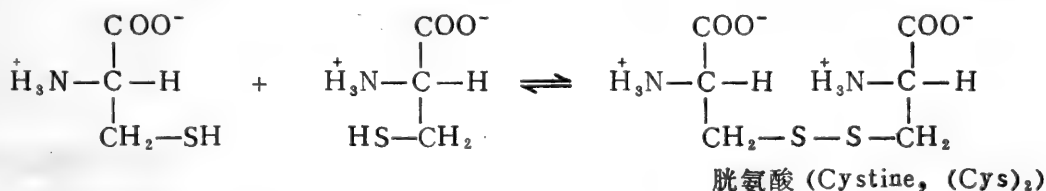
酪氨酸 (α -氨基- β -对羟基苯基丙酸)
(Tyrosine, Tyr., Y)



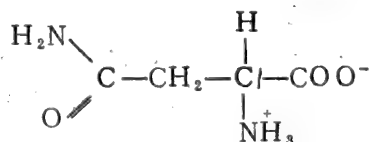
半胱氨酸 (α -氨基- β -巯基丙酸)
(Cysteine, Cys., C)



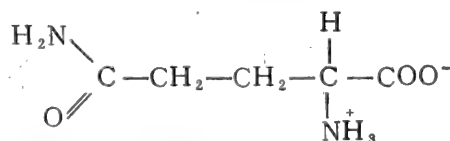
在蛋白质分子中半胱氨酸常以它的氧化型胱氨酸的形式存在，即两分子的半胱氨酸以共价键（二硫键）相连而形成胱氨酸。



天冬酰胺
(Asparagine, Asn., N)



谷氨酰胺
(Glutamine, Gln., Q)



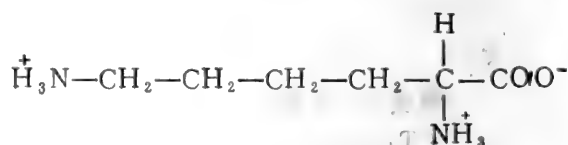
在这组氨基酸中，甘氨酸并不含极性侧链基团，其侧链仅仅是一个氢原子，似乎应属于非极性 R 基氨基酸类。但由于侧链的氢原子基本上不影响强极性的 α -氨基和 α -羧基，故仍把它放在这类氨基酸中。丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸的侧链极性是由其侧链上的羟基（—OH）产生的；半胱氨酸的侧链极性是由其侧链上的巯基（—SH）产生的；天冬酰胺和谷氨酰胺

的侧链极性是由它们的侧链酰胺基产生的。这类氨基酸由于含有极性的侧链基团，与水的相互作用得到了加强，即能同水分子形成氢键，故在水中的溶解度比非极性的 R 基氨基酸大。

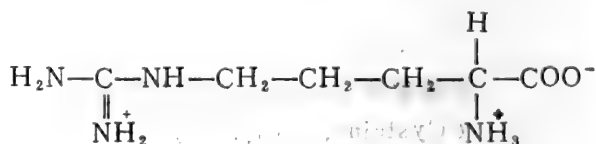
虽然，这组氨基酸都属于无电荷的极性侧链 R 基氨基酸，但由于酪氨酸的酚羟基和半胱氨酸的巯基的特殊结构，在生理 pH 范围内的电离失去质子的倾向比同组其他氨基酸的侧链 R 基团要大得多。因此，这两种氨基酸的侧链基团仍可滴定，只不过这两种氨基酸的侧链的电离很弱罢了。

3. 带正电荷的侧链极性 R 基氨基酸

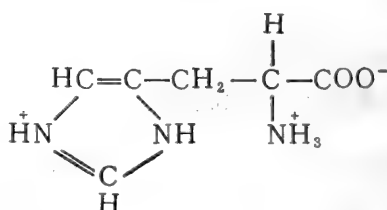
赖氨酸 (α -, ϵ -二氨基己酸)
(Lysine, Lys., K)



精氨酸 (α -氨基- δ -胍基戊酸)
(Arginine, Arg., R)



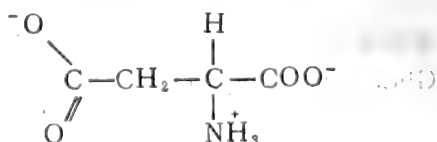
组氨酸 (α -氨基- β -咪唑基丙酸)
(Histidine, His., H)



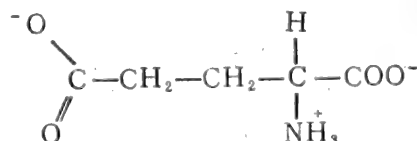
这是一组碱性氨基酸，都具有三个可解的基团。赖氨酸 ϵ -氨基和精氨酸 δ -胍基在生理 pH 范围接受一个 H^+ 后都带上正电荷，整个分子在此条件下就带上了一个净正电荷。组氨酸的侧链基团含有一个 pK_a 值为 6.0 的咪唑基，故在 pH 7 时，组氨酸咪唑基质子化的程度低于 10%。组氨酸是一种弱碱性氨基酸，它的等电点为 7.6，是唯一接近生理 pH 的氨基酸。这样就使得组氨酸在蛋白质行使功能的过程中起很重要的作用的。

4. 带负电荷的侧链 R 基氨基酸

天冬氨酸 (α -氨基丁二酸)
(Aspartic acid, Asp., D)



谷氨酸 (α -氨基戊二酸)
(Glutamic acid, Glu., E)

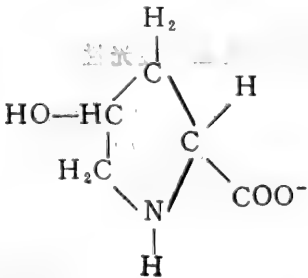


这两个氨基酸是酸性氨基酸。它们的侧链 R 基上的 —COOH 在生理 pH 条件下完全解离，释放出 H^+ 后带上了负电荷。

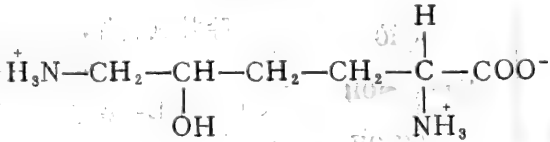
以上20种 α -氨基酸都是蛋白质分子中常见到的，它们在遗传信息上都具有相应的密码子，是蛋白质生物合成的原始材料。

在蛋白质的氨基酸组成中，除了上面介绍的20种氨基酸外，还发现一些氨基酸只存在于少数蛋白质中，如 L-羟脯氨酸和 L-羟赖氨酸存在于胶原蛋白中，L-二碘酪氨酸和 L-甲状腺素存在于甲状腺球蛋白中。

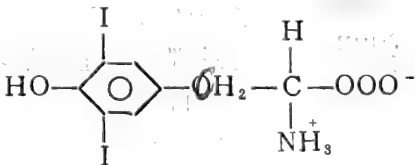
羟脯氨酸 (4-羟基四氢吡咯-2-羧酸)
(Hydroxyproline, Hyp.)



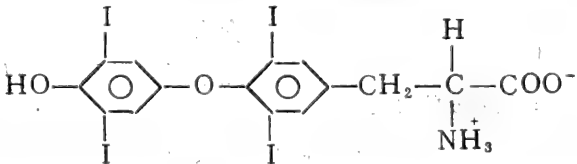
羟赖氨酸 (α , ϵ -二氨基- δ -羟基己酸)
(Hydroxylysine, Hyl.)



二碘酪氨酸
(Diiodotyrosine)



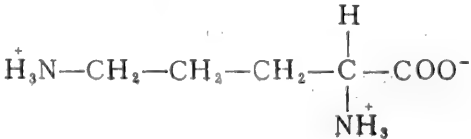
甲状腺素
(Thyroxine)



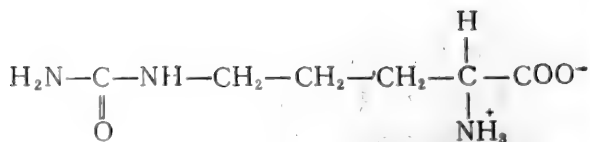
近年来，在某些蛋白质中还发现其他一些氨基酸。例如凝血酶分子中的 γ -羧基谷氨酸。这样一些氨基酸都是在蛋白质生物合成之后，通过酶促化学修饰转变而成的，并不存在这些氨基酸的遗传密码子。

此外，还有一些氨基酸，并不出现在蛋白质多肽链中，而是以游离的状态存在于生物体内。它们通常是蛋白质代谢的中间产物。例如 L-鸟氨酸和 L-瓜氨酸等。

鸟氨酸 (α , δ -二氨基戊酸)
(Ornithine, Orn.)



瓜氨酸 (α -氨基- δ -脲基戊酸)
(Citrulline, cit.)



按照“含有氨基和羧基的有机化合物都叫做氨基酸”的定义，则还可以在生物细胞中找到好多种氨基酸。大多数是蛋白质中存在的那些 α -氨基酸的衍生物。也有一些是 β -、 γ -或 δ -氨基酸。

二、氨基酸的构型和旋光性

组成蛋白质的20种 α -氨基酸除甘氨酸外，其余所有氨基酸的 α -碳原子周围都连有四个不同的原子和基团。这样的碳原子就是不对称碳原子。根据碳原子 sp^3 轨道的四面体性质，四个不同的原子和基团在碳原子周围空间上有四种不同的排列，它们彼此之间互成镜影，不能重叠，成为两个相对映的异构体，象在前面讨论过的单糖那样，是两种不同的构型。 α -氨基酸的构型的决定是以 D-、L-甘油醛或 D-、L-乳酸为标准而确定的。

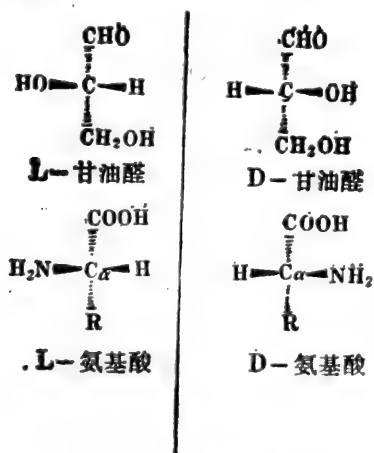


图 8-1 α -氨基酸的构型

除甘氨酸外，所有的 α -氨基酸都有 D-型和 L-型之分。但是，存在于蛋白质中的氨基酸都是 L-型的。虽然 D-和 L-型氨基酸在物理性质和化学性质等方面有许多相同，但它们在生理功能上却是不同的。D-氨基酸一般不为生物所利用。但有些细菌却能小心地利用 D-氨基酸去制造对其他生物有毒的某些肽类，例如具有抗菌作用的短杆菌肽 S 中含有 D-苯丙氨酸。动物的肾脏有破坏 D-氨基酸的能力，显然就排除了形成任何有毒肽类的可能性。

含有不对称碳原子的化合物都具有旋光活性。分子的这种光学活性就称为分子的手性或手征性 (Chirality)。

除甘氨酸外的所有 α -氨基酸都具有旋光性。但是，各种氨基酸的旋光性彼此是不相同的。旋光性的这种差别是由于侧链 R 基团的不同所致。

在 pH7.0 测定氨基酸的旋光性时，有些是右旋，用 (+) 号表示；有些是左旋，用 (-) 号表示。一般说来，一氨基一羧基氨基酸在其等电点状态时左旋性最大。但是，应该指出的是，D-型和 L-型与旋光方向并不呈对应关系。D-型和 L-型指的是不对称碳原子的四面体中的四个不同的原子和基团的绝对构型，是以 D-、L-乳酸或 D-、L-甘油醛为基准人为规定的；而旋光性则是含有不对称碳原子的化合物能使平面偏振光的偏振面发生旋转的能力。因此，两者是不能混淆的。实际上，有的 L-氨基酸是左旋，有的 L-氨基酸是右旋。

氨基酸的旋光性也是用比旋度 $[\alpha]_D^{25}$ 来表示的。每种氨基酸在一定条件下 (溶剂、浓度、温度) 都有一定的比旋光值，可以作为氨基酸的特征性常数用于定性分析。

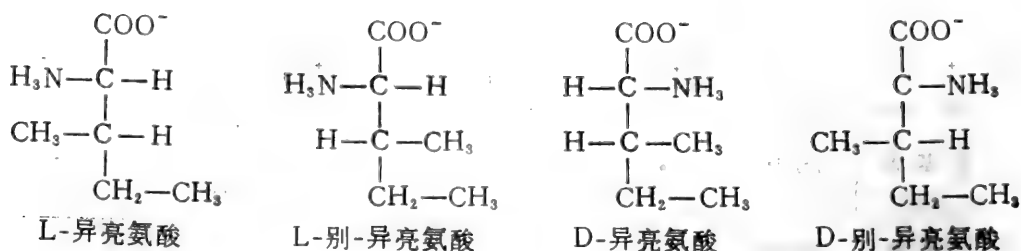
当某种氨基酸以 D-型和 L-型等量等浓度混合时，彼此旋光抵消，即失去旋光性。这

表3-1 蛋白质中常见氨基酸的一些性质

氨基酸	分子量	在水中的溶解度 (克/100克, 25°C)	比旋光值 $[\alpha]_D^{25}$ (1—2%)		熔点 (°C)
			H ₂ O	5 N HCl	
甘氨酸	75.05	24.99			290
丙氨酸	89.06	16.51	+1.8	+14.6	297
缬氨酸	117.09	8.85	+5.6	+28.3	292— 295
亮氨酸	131.11	2.19	-11.0	+16.0	337
异亮氨酸	131.11	4.12	+12.4	+39.5	284
丝氨酸	105.06	25 (20°C)	-7.5	+15.1	228
苏氨酸	119.18	20.5	-28.5	-15.0	253
天冬氨酸	133.6	0.50	+5.0	+25.4	270
天冬酰胺	132.6	3.11 (28°C)	-5.3	+33.2 (3N HCl)	236
谷氨酸	147.08	0.84	+12.0	+31.8	249
谷氨酰胺	146.08	4.25 (盐酸盐)	+6.3	+31.8 (1N HCl)	185
精氨酸	174.4	71.8 (20°C)	+12.5	+27.6	238
赖氨酸	146.13	66.6(20°C) (盐酸盐)	+13.5	+26.0	224— 225
组氨酸	155.09	4.29	-38.5	+11.8	277
半胱氨酸	121.12	溶于水	-16.5	+6.5	178
胱氨酸	240.33	0.011		-232	261
[甲硫氨酸	149.15	5.14(20°C)	-10.0	+23.2	283
苯丙氨酸	165.09	2.96	-34.5	-4.5	284
酪氨酸	181.09	0.046		-10.0	344
色氨酸	204.11	1.14	-33.7	+2.8 (1N HCl)	282
脯氨酸	115.08	162.3	-86.2	-60.4	222
羟脯氨酸	131.08	36.11	-76.0	-50.0	

种现象就叫做外消旋。用化学方法合成的氨基酸是 D-、L-各半的混合物，称为 D-、L-型，没有旋光性。用碱水解蛋白质时，得到的氨基酸也是没有旋光性的 D-、L-型。但是，把它们分开后，彼此的旋光性又表现出来了。

异亮氨酸、苏氨酸等除含有 α -不对称碳原子外，还含有第二个不对称碳原子。因此，就有四种可能的异构体。但是，只有 L-异构体用于蛋白质合成。异亮氨酸的四种异构体可示如下：



三、紫外吸收特性

虽然蛋白质中存在的20种氨基酸在可见光区均无光吸收特性，但是酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸由于具有苯环的共轭双键结构，因而在紫外光区具有吸收特性。酪氨酸在紫外光区的最大吸收在 $\lambda = 278\text{nm}$ ，其克分子消光系数 $\epsilon_{278} = 1.1 \times 10^3$ ；色氨酸的最大吸收在 $\lambda = 279\text{nm}$ ，其克分子消光系数 $\epsilon_{279} = 5.2 \times 10^3$ 。可以依据下面的公式利用紫外分光光度计测定这些氨基酸的含量。

$$C = \frac{A}{\epsilon \cdot L}$$

式中 C 为克分子浓度， ϵ 为克分子消光系数， A 为所测样品的消光值， L 为比色杯内径（光程一般为 1cm ）。

蛋白质一般都含有酪氨酸或色氨酸残基，利用这两种氨基酸的紫外吸收特征测定蛋白质的含量是很方便的。使用紫外分光光度计测定蛋白质含量时，选用的波长为 280nm ，若没有干扰物质存在，则在 280nm 的吸收可用来测定 $0.1 \sim 0.5\text{mg/ml}$ 的蛋白质溶液。苯丙氨酸的最大吸收在 259nm 处，在 280nm 处对蛋白质的紫外测定所起的作用甚小。

四、氨基酸的酸碱性质

氨基酸的酸碱性质是氨基酸最重要的性质。研究氨基酸的酸碱性质对于理解蛋白质的性质具有特别重要的意义。氨基酸的酸碱性质也是氨基酸分离、鉴定和定量分析的基础。

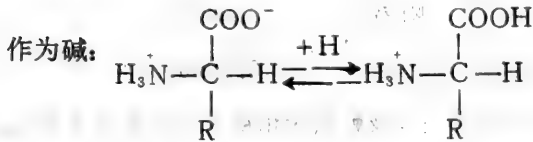
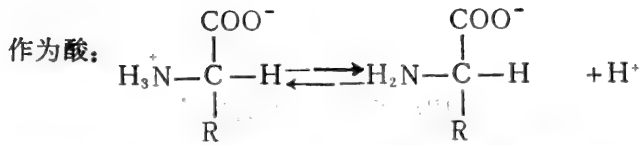
1. 氨基酸的两性电离性质

氨基酸在生理 pH 溶液中，其 α -氨基和 α -羧基都是可电离的。羧基解离脱去 H^+ 而带负电荷，氨基接受 H^+ 而带正电荷。所以氨基酸是两性电解质。在水中或在晶体状态下，并

不是以 $\text{R}-\text{C}(\text{H})(\text{NH}_2)\text{COOH}$ 形式存在，而主要是以 $\text{R}-\text{C}(\text{H})(\text{NH}_3^+)\text{COO}^-$ 形式，即两性离子 (zwitterion)

的形式存在。所谓两性离子就是指同一分子中含有相反性质的两种离解基团。在氨基酸分子中含有氨基正离子和羧基负离子。这种带有正负电荷的形式又叫做兼性状态或等离子状态。从化学本质上讲，两性离子是一种内盐，内盐都具有高熔点和易溶于水的性质。

按照 Bronsted 的酸碱概念，凡是能释放出质子的就是酸，凡是能接受质子的就是碱。由于氨基酸是两性化合物，因此，它既可以表现出酸的性质又可以表现出碱的性质，



氨基酸作为一种两性电解质，它在水溶液中的带电情况，随溶液的 H^+ 浓度(即 pH 值)变化而不同，即是说，在不同的 pH 值条件下，氨基酸可以解离成带不同的电荷。当向处于两性离子状态的氨基酸水溶液加入酸时，溶液的 pH 值降低， $-\text{COO}^-$ 基接受质子，表现出碱(共轭碱)的特征，变成不带电荷的 $-\text{COOH}$ ，整个氨基酸分子带上一个净正电荷。当加入碱时，溶液的 pH 升高， $-\text{N}^+\text{H}_3$ 释放出质子，表现出酸(共轭酸)的特征，变成不带电荷的氨基，释放出的 H^+ 与 OH^- 中和，整个氨基酸分子带上一个净负电荷。上述变化以甘氨酸为例表示如下：



由上式可以看出，氨基酸的解离方式取决于本身所处环境的 pH 值。也就是说，在不同的 pH 值条件下，氨基酸可以阳离子、阴离子和两性离子三种形式存在。

甘氨酸在不同的 pH 条件下，两性离子状态存在的比例如图3—2所示。我们可以看出

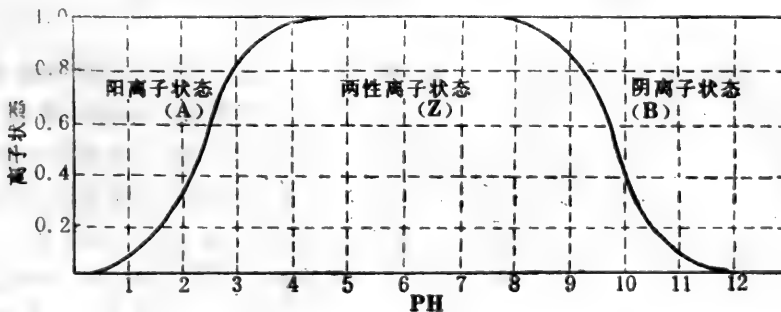


图3—2 甘氨酸在不同的pH下，两性离子存在的状况

大多数一氨基—羧基氨基酸都具有类似的情况

甘氨酸在以 pH6为中心的一个较宽的 pH 范围内主要以两性离子存在。一般来说，具有一氨基—羧基的氨基酸在生理液态的条件下主要以两性离子存在。例如在 pH7.4，甘氨酸的各种形态分配如下：

$\text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH}_2 - \text{COO}^-$	两性离子	99.58%
$\text{H}_2\text{N} - \text{CH}_2 - \text{COO}^-$	阴离子	0.41%
$\text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH}_2 - \text{COOH}$	阳离子	0.00089%
$\text{H}_2\text{N} - \text{CH}_2 - \text{COOH}$	无电荷	0.0000037%

天冬氨酸和谷氨酸的侧链羧基以及赖氨酸和精氨酸的侧链氨基也具有酸碱解离性质。当这些氨基酸结合形成蛋白质时，其侧链基团解离是蛋白质两性解离的主要基础。天冬氨酸和谷氨酸是含一氨基二羧基的酸性氨基酸，它们的离子状态随 H^+ 浓度变化而变化的情况如图 3—3 所示。从图 3—3 我们可以看出，这两个氨基酸的两性离子状态出现在酸性溶液中，而在生理 pH 条件下却带上一个负电荷，以阴离子状态存在。

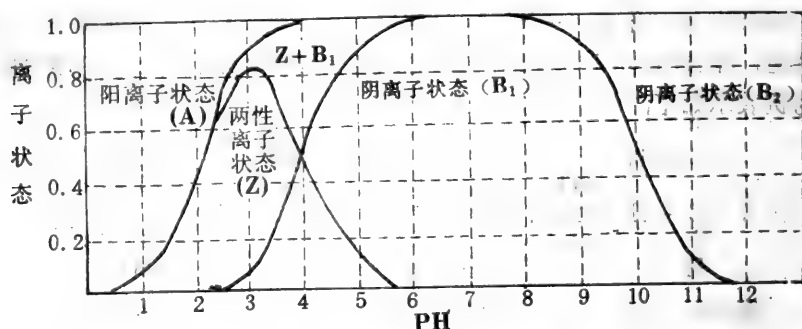


图3—3 酸性氨基酸在不同pH下的离子状态

赖氨酸和精氨酸在不同 pH 条件下的解离情况则刚好同酸性氨基酸相反。在生理 pH 条件下都带一个净正电荷，以阳离子状态存在。组氨酸的解离前面已叙及。

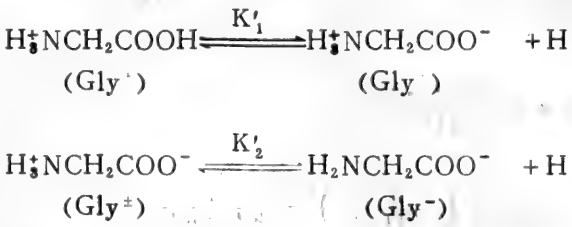
2. 氨基酸的等电点

由上所述，改变氨基酸溶液的 pH 值，可以使它带上不同的电荷。在直流电场的作用下，就会有不同的电泳行为。在某一特定的 pH 值条件下，氨基酸主要以两性离子状态存在，溶液中的氨基酸分子所带净电荷为零，而且解离成阳离子和阴离子的数目和趋势相等，虽有外加电场的存在，但它既不移向正极也不移向负极，这时溶液的 pH 值即称为该氨基酸的等电点 (Isoelectric point)。在水溶液中，氨基酸的等电点就是它的等离子点。在等离子点时，分子呈现为等电型离子。所谓等离子点就是氨基酸由于质子 (H^+) 的解离与缔合而使得其分子呈现等离子状态的 pH 值。氨基酸在水溶液中的等电点或等离子点用符号 pI 表示。

氨基酸分子上的 α -氨基、 α -羧基以及其他侧链可解离的基团都有一个特征性的解离常数的负对数 pK'_a 值。由于每种氨基酸的酸性和碱性基团的数目不同，以及每个可解离基团 pK'_a 值的差别，因而使得不同的氨基酸有不同的等电点。那么 pK'_a 值与等电点之间有什么关系呢？对于一氨基一羧基的中性氨基酸来说，其等电点 $\text{pI} = \frac{1}{2} (\text{pK}'_{a1} + \text{pK}'_{a2})$ 。上述关系

可通过氨基酸的酸碱滴定曲线来说明。

甘氨酸（其他中性氨基酸也可）在酸性溶液中接受质子后，即以 $\text{H}_3^+\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ 形式存在，这可以看成是一个二元弱酸。当用碱完全滴定时它能释放出两个质子。弱酸的解离是分步进行的。



这里 K'_1 和 K'_2 分别代表甘氨酸分步解离的两个表现解离常数。根据弱酸的解离，按照质量作用定律，于是就有：

$$K'_1 = \frac{[\text{Gly}^+][\text{H}^+]}{[\text{Gly}^+]} \qquad K'_2 = \frac{[\text{Gly}^-][\text{H}^+]}{[\text{Gly}^+]}$$

即： $\frac{1}{[\text{H}^+]} = \frac{1}{K'_1} \cdot \frac{[\text{Gly}^+]}{[\text{Gly}^+]}$ $\frac{1}{[\text{H}^+]} = \frac{1}{K'_2} \cdot \frac{[\text{Gly}^-]}{[\text{Gly}^+]}$

两边取对数：

$$\log \frac{1}{[\text{H}^+]} = \log \frac{1}{K'_1} + \log \frac{[\text{Gly}^+]}{[\text{Gly}^+]}$$

$$\log \frac{1}{[\text{H}^+]} = \log \frac{1}{K'_2} + \log \frac{[\text{Gly}^-]}{[\text{Gly}^+]}$$

亦即： $\text{pH} = \text{p}K'_{a1} + \log \frac{[\text{Gly}^+]}{[\text{Gly}^+]}$ (1)

$\text{pH} = \text{p}K'_{a2} + \log \frac{[\text{Gly}^-]}{[\text{Gly}^+]}$ (2)

当 $[\text{Gly}^+] = [\text{Gly}^+]$ 时，则 (1) 式为 $\text{pH} = \text{p}K'_{a1}$ ，

当 $[\text{Gly}^+] = [\text{Gly}^-]$ 时，则 (2) 式为 $\text{pH} = \text{p}K'_{a2}$ 。

当把甘氨酸溶于水时，溶液的 pH 值大约是 6.0，在直流电场的作用下，它不移动，这表明它溶于水时呈电中性。用标准的酸、碱滴定时测得如图 3—4 所示的曲线。从滴定曲线中，我们可以看出当逐步加入标准 HCl 时，pH 逐渐降低。 $\text{H}_3^+\text{NCH}_2\text{COO}^-$ 中的 $-\text{COO}^-$ 接受 H^+ ，使其部分转变成 $\text{H}_3^+\text{NCH}_2\text{COOH}$ 。当加入的 HCl 当量数等于滴定完全的一半时，有 50% 的 $[\text{H}_3^+\text{NCH}_2\text{COO}^-]$ 变成了 $[\text{H}_3^+\text{NCH}_2\text{COOH}]$ ，此时溶液的 pH 值为 2.34，刚好处于曲线 A 部分的中点。根据 (1) 式，则此时的 pH 就是 $\text{p}K'_{a1}$ 。当逐步加入标准 NaOH 时，pH 值逐渐升高。 $\text{H}_3^+\text{NCH}_2\text{COO}^-$ 中的 $-\text{N}^+\text{H}_3$ 释放出的 H^+ 被 OH^- 中和， $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COO}^-$ 逐渐生成。当加入的 NaOH 当量数等于滴定完全的一半时，有 50% 的 $[\text{H}_3^+\text{NCH}_2\text{COO}^-]$ 变成 $[\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COO}^-]$ ，刚好处于曲线 B 部分的中点。此时溶液中的 pH

值为9.6。根据(2)式,则此时的 pH 即为 pK'_{a2} 。

在等电点时,由于净电荷为零,于是就有

$$[\text{Gly}^+] = [\text{Gly}^-]$$

$$\text{而 } [\text{Gly}^+] = \frac{[\text{Gly}^+][\text{H}^+]}{K_1}, \quad [\text{Gly}^-] = \frac{[\text{Gly}^+] \cdot K'_2}{[\text{H}^+]}$$

$$\text{于是: } \frac{[\text{Gly}^+][\text{H}^+]}{K_1} = \frac{[\text{Gly}^+] \cdot K'_2}{[\text{H}^+]}$$

$$\text{即: } [\text{H}^+]^2 = K'_1 \times K'_2, \text{ 亦即: } \left(\frac{1}{[\text{H}^+]} \right)^2 = \frac{1}{K'_1 \times K'_2}$$

取对数后即得:

$$pI = pH = \frac{pK'_{a1} + pK'_{a2}}{2} = \frac{2.34 + 9.60}{2} = 5.97$$

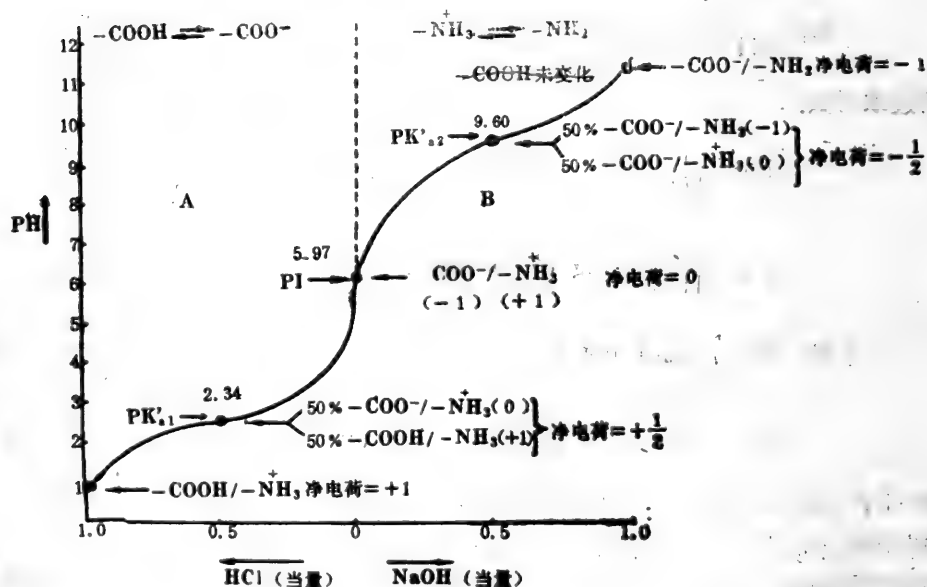


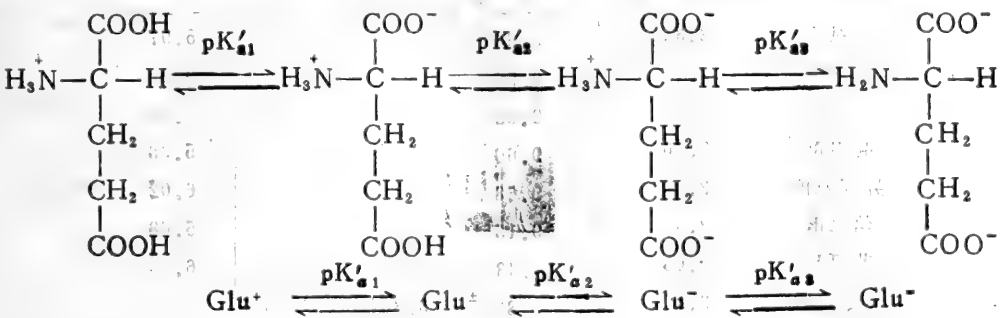
图3-4 甘氨酸的滴定曲线

这里需要说明的是,若 NaOH 滴定的不是 $-\text{N}^+\text{H}_3$ 上的 H^+ ,而是 $-\text{COOH}$ 上的 H^+ ,那么至滴定中点时, pH 应是 2.34,而不应该是 9.60,因为乙酸的 $-\text{COOH}$ 的 pK'_a 值为 4.74。这就难以使人相信甘氨酸与乙酸的结构上的差别而导致甘氨酸羧基的酸性减小 10%。事实上,滴定中点的 pH 是 9.6,不是 2.34。而氨基的 pK'_a 值一般是在 9.0—10.0 范围内。因此,NaOH 滴定的是 $-\text{N}^+\text{H}_3$ 上的 H^+ ,不是 $-\text{COOH}$ 上的 H^+ 。同理, HCl 滴定的是 $-\text{COO}^-$,

而不是 $-\text{NH}_2$ 。这就证明甘氨酸在水溶液中是以 $\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{COO}^- \\ | \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$ 形式存在,而不是以

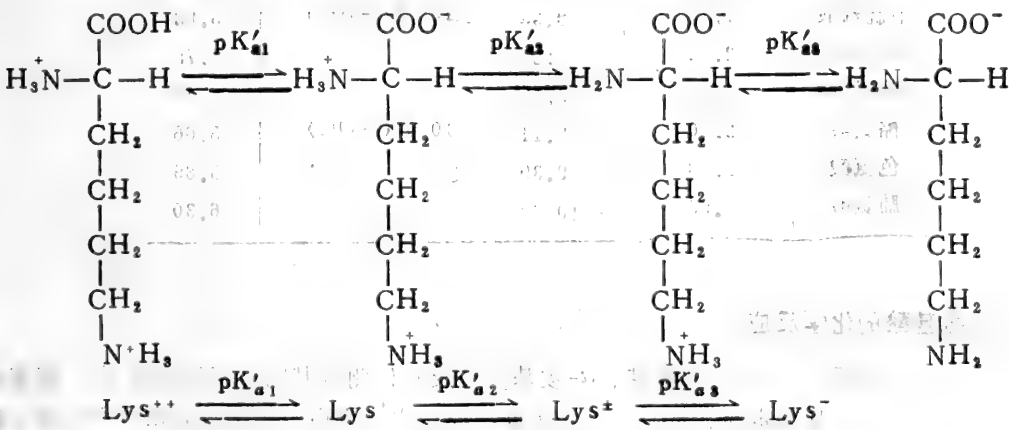


对于含有三个可解离基团的氨基酸，只要先写出它的解离式子，然后取等电状态两边的 pK'_a 值的算术平均值即为该氨基酸的等电点。例如谷氨酸的解离及其 pI 值的求法：



在等电状态下 (Glu^+)， Glu^- 含量甚微，可以不必考虑。故 Glu 的等电点 $pI = \frac{1}{2}(pK'_{a1} + pK'_{a2}) = \frac{1}{2}(2.19 + 4.25) = 3.22$ 。

同理亦可以找出碱性氨基酸的 pK'_a 值与其等电点之间的关系。例如赖氨酸：



赖氨酸的等电状态是 Lys^+ ，所以它的 $pI = \frac{1}{2}(pK'_{a2} + pK'_{a3}) = \frac{1}{2}(8.95 + 10.55) = 9.74$ 。

由于各种氨基酸都有它特定的等电点 (表3—2)，当溶液的 pH 值小于某氨基酸的等电点时，则该氨基酸带正电荷；若溶液的 pH 值大于等电点时，则该氨基酸带负电荷。因此，在同一 pH 值条件下，各种氨基酸所带的电荷不同。例如，在 $pH 6.0$ 的溶液中，丙氨酸是以两性离子的形式存在，而天冬氨酸解离成为阴离子，精氨酸则解离成为阳离子。根据这一性质，通过调节氨基酸混合液的 pH 值，以改变混合液中各种氨基酸的电荷数，使其中各氨基酸所带电荷造成较大差异，再应用离子交换法或电泳法将混合液中的各种氨基酸分离出来。

当氨基酸处于等电状态时，由于氨基酸之间的静电引力的作用，氨基酸分子彼此聚集，

此时溶解度最小，容易沉淀析出。利用这一性质可以分离制备某些氨基酸。

表3-2 氨基酸的表现解离常数和等电点(25°C)

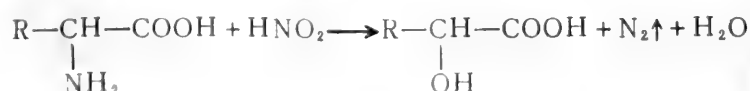
氨基酸	pK'_{-COOH}	$pK'_{-NH_3^+}$	pK'_R	pI
甘氨酸	2.34	9.60		5.97
丙氨酸	2.34	9.69		6.02
缬氨酸	2.32	9.62		5.97
亮氨酸	2.36	9.60		5.98
异亮氨酸	2.36	9.68		6.02
丝氨酸	2.31	9.15		5.68
苏氨酸	2.63	10.43		6.53
天冬氨酸	2.09	9.82	3.86(β -COOH)	2.97
天冬酰胺	2.02	8.8		5.41
谷氨酸	2.19	9.67	4.25(γ -COOH)	3.22
谷氨酰胺	2.17	9.13		5.65
精氨酸	2.17	9.04	12.8(胍基)	10.76
赖氨酸	2.18	8.95	10.53(ϵ -N $^+$ H $_2$)	9.74
组氨酸	1.82	9.17	6.00(咪唑基)	7.59
半胱氨酸	1.71	8.33	10.78(-SH)	5.02
甲硫氨酸	2.28	9.21		5.75
苯丙氨酸	1.83	9.13		5.48
酪氨酸	2.20	9.11	10.07(-OH)	5.66
色氨酸	2.38	9.39		5.89
脯氨酸	1.99	10.60		6.30

五、氨基酸的化学反应

氨基酸的化学反应与它的 α -氨基、 α -羧基，以及其他侧链基团有密切的关系。氨基酸的化学反应不仅是氨基酸定性、定量分析的依据，而且也是蛋白质化学合成和蛋白质氨基酸顺序测定的基础。这里我们介绍有关的重要化学反应。

1. 与亚硝酸的反应

氨基酸的 α -氨基与亚硝酸的反应和伯胺与亚硝酸的反应相同。氨基酸的 α -氨基定量地与亚硝酸作用产生羟酸和氮气(N $_2$)。产生的氮气一半来自氨基酸分子上的 α -氨基氮，一半来自亚硝酸中的氮。故在一定条件下测定反应所释放的氮气的体积，便可计算出氨基酸的含量，这是范氏氨基氮测定方法的基础。

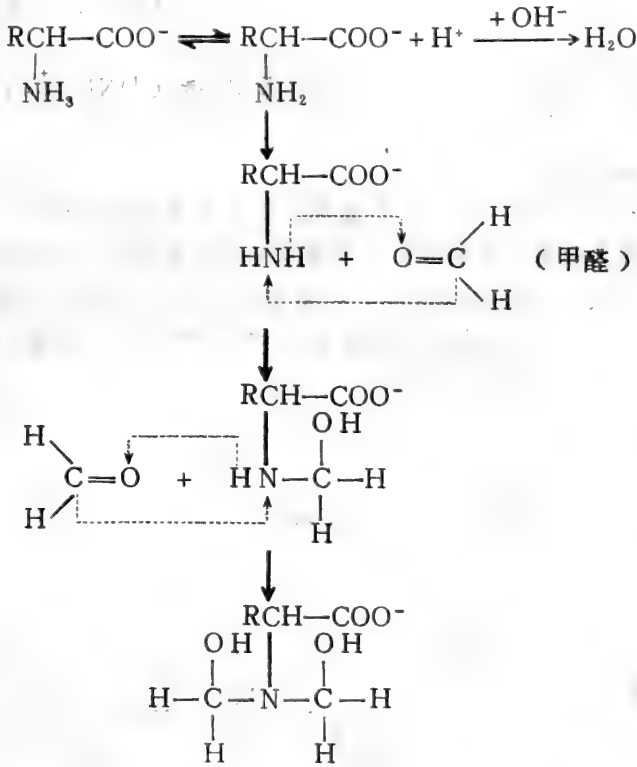


此法较为准确，反应很快，是定量分析氨基酸的常用方法。赖氨酸的ε-氨基与亚硝酸的作用较慢，脯氨酸、羟脯氨酸环中的亚氨基以及精氨酸、组氨酸和色氨酸环中的氮皆不与亚硝酸反应。

由于亚硝酸只能与游离的α-氨基起反应，而蛋白质分子中的游离的α-氨基只限于一端，因此能够测得的游离α-氨基是很微的。但是，当蛋白质被水解时，随着氨基酸的释放，游离的α-氨基增多，与亚硝酸反应释放出的氮气的量亦随之增加。而蛋白质的总氮量在水解过程中是不变的。所以通过测定水解过程中α-氨基氮量的变化以及与总氮量的比例关系，可以判断蛋白质的水解程度。

2. 与甲醛的反应

氨基酸的α-氨基与中性甲醛的反应可表示如下：

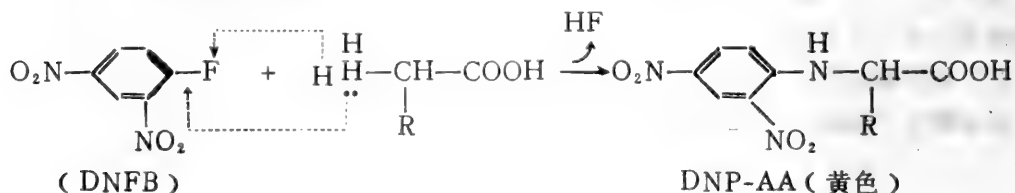


由于 -NH₃ 是一个弱酸，它完全电离时的 pH 约在 12—13，用一般的指示剂很难准确地判断其滴定终点。所以在一般条件下不能直接用酸碱滴定法来定量地测定氨基酸。在中性 pH 和常温条件下，甲醛能很快与氨基酸上的α-氨基结合，产生含羟基的化合物。羟基诱导电子，使 N 上的电子密度降低，N 就不再吸引质子。这样，H⁺ 游离出来，不会再与 N 结合，使上述平衡向右移动，促使 -NH₃ 上的 H⁺ 释放出来，使溶液的酸性增加，亦即降低了 -NH₃ 的 pK'_a 值，使 -NH₃ 变为较强的酸，滴定的终点移到 pH9 左右。这样就可用酚酞作指示剂，用 NaOH 滴定，每释放出一个 H⁺ 就相当于一个氨基酸。这一实验也表明

被碱滴定的基团是 $-\text{NH}_3^+$ 而不是 $-\text{COOH}$ 。

3. 与二硝基氟苯的反应

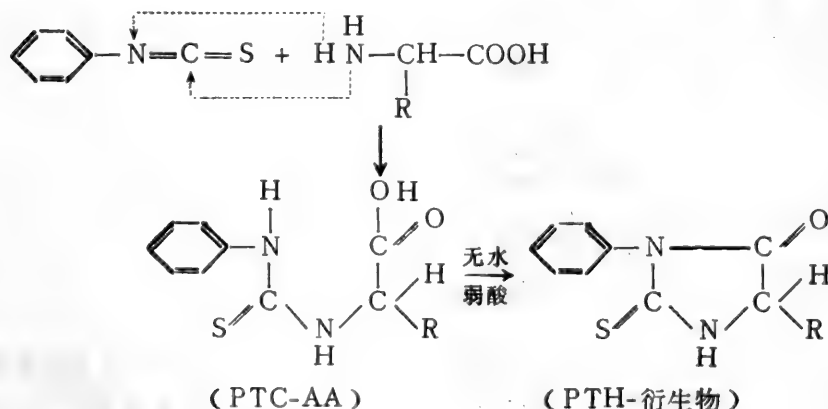
卤代烃可与氨作用生成胺。氨基酸上的 α -氨基相当于伯胺，可以与卤代烃起反应生成胺，即氨基酸的氨基上的一个 H 被烃基（包括环烃及其衍生物）取代。2,4-二硝基氟苯（DNFB）可视为环烃的衍生物，其反应可表示如下：



这一反应是定量转变的，反应后生成黄色的二硝基苯氨基酸（DNP-AA）。此反应可用于肽链的 N-末端分析。

4. 与苯异硫氰酸的反应

同理，氨基酸的或者肽链 N-末端的 α -氨基也能与苯异硫氰酸（PTC）反应产生相应的苯氨基硫甲酰氨基酸或苯氨基硫甲酰多肽。苯氨基硫甲酰氨基酸（PTC-AA）在无水酸中环化变为苯乙内酰硫脲（Phenylthiohydantoin，简为 PTH）的衍生物，后者在酸中很稳定。反应得到的产物无色，可用层析法加以分离鉴定。此法在肽链 N-末端分析和 N-端氨基酸顺序的测定中很有用。反应过程可示如下：



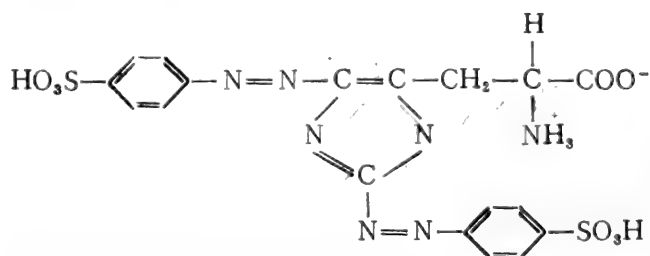
5. 与丹磺酰氯的反应

氨基酸的 α -氨基或肽链 N-末端游离的 α -氨基可以与二甲氨基萘磺酰氯（简称丹磺酰氯，或用 DNS-Cl 表示）起反应生成丹磺酰氯的衍生物。由于丹磺酰氯是一种荧光试剂，与 α -氨基反应所生成的丹磺酰衍生物具有很强的荧光，可用于微量分析。故丹磺酰氯在肽链 N-端氨基酸分析中是很有用的试剂。

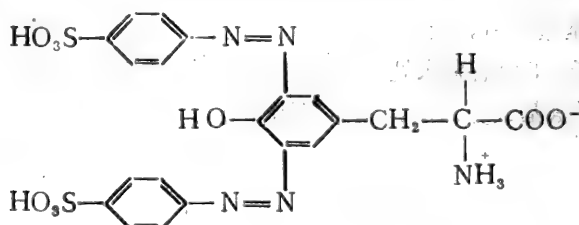


(1) 组氨酸和酪氨酸的偶氮反应

偶氮化合物能与酚核或咪唑基起反应产生有色物质。组氨酸含有咪唑基，可以和偶氮苯磺酸结合产生鲜红色的化合物。

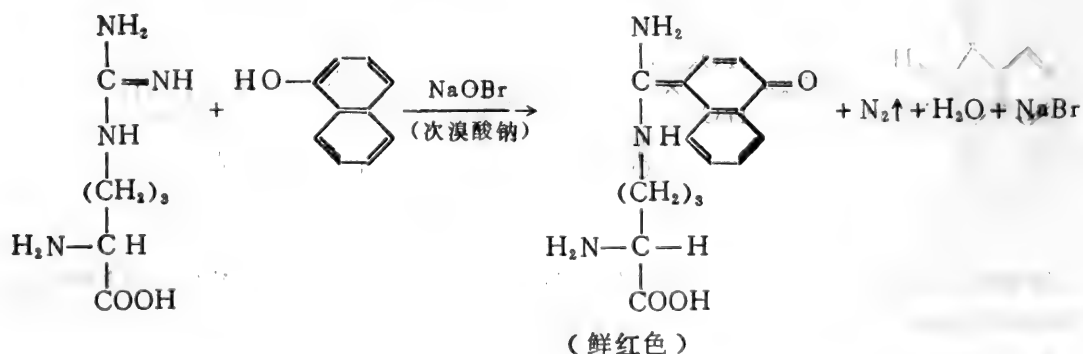


酪氨酸的苯酚基与偶氮苯磺酸结合成为橙红色的化合物。



(2) 精氨酸的坂口反应 (Sakaguchi)

精氨酸含有胍基，能与坂口试剂起反应产生鲜红色的化合物，可用作精氨酸的定性或定量测定。



(3) 色氨酸的颜色反应

在浓硫酸的存在下，乙醛酸能与色氨酸缩合成紫红色物质。浓硫酸在反应中起脱水作用。

六、氨基酸的分离和分析

氨基酸的分离和分析在理论上和实际应用中都是一项极为重要的工作。在蛋白质的氨基酸的组成分析和氨基酸顺序的测定中需要对氨基酸进行分离和分析。在生产实际中,水解法制备氨基酸以及微生物发酵法进行氨基酸的生产,也需要进行氨基酸的分离和分析。

分离纯化氨基酸的方法是很多的。例如,可利用氨基酸等电点的差异,采取调节等电点的方法或电泳法或其他某些专门试剂进行某氨基酸或某几种氨基酸的分离纯化。若要从某溶液中分离出若干种或全部氨基酸,可采用离子交换法。此法优点突出,分离和分析兼而有之。若要分离并鉴定出某溶液所含氨基酸及其种类,则可采用层析法或电泳-层析法。这里仅从原理上对纸层析法和离子交换法作简单介绍。

1. 纸上层析法

纸上层析法是鉴定氨基酸的一种简便可行的方法,是分配层析原理的一种应用。分配层析 (Partition chromatography) 是利用不同物质在两个互不相溶混的溶剂中分配系数不同而达到彼此分离的目的。分配系数 (α) 可表示如下:

$$\alpha = \frac{\text{溶质在固定相中的浓度}}{\text{溶质在流动相中的浓度}}$$

一种物质在某溶剂系统中的分配系数在一定温度下是一个常数。

纸上层析法以滤纸作为惰性支持物。滤纸纤维上众多的一OH基是亲水的极性基团,可以吸附一层水作为固定相(或静止相)。通常把被水饱和的有机溶剂相作为流动相。

为了解释纸上层析的原理,可以把滤纸视为由若干板层构成的一个层析柱。滤纸吸附的水即为固定相S,有机溶剂作为流动相M。两相互相接触而不相混溶。设有A、B两种物质,A在两相中的分配系数等于1,B在两相中的分配系数等于1/3。把A、B两种物质的混合样品点在滤纸板层的第一层。当流动相进入到第一层时,溶质根据各自的分配系数在第一层的两相中分配(如图3—5(1));流动相继续向前移动,此时第一层固定相中的溶质在新流来的流动相和第一层固定相之间重新分配;原先流经第一层的流动相流到第二层后,所携带的溶质便在第二层中的固定相和流动相之间重新分配(图3—5(2))。如此类推,经三次抽提分配即可看出A和B的最浓部分已经分开。A物质在第二层最浓,B物质在第三层最浓(图3—5(3)b和(4))。如果再经若干次抽提分配,A、B两物质即可分开。

物质分离后在图谱上的位置可用比移值 R_f 来表示。 R_f 值的定义是,在一定的条件下,被分离物质从原点到层析斑点中心的距离与从原点到溶剂前沿的距离的比值。

$$R_f = \frac{\text{原点到层析斑点中心的距离}}{\text{原点到溶剂前沿的距离}}$$

由于各种溶质在一定温度、溶剂等条件下,都有特定的 R_f 值,故可以根据 R_f 值定性鉴定被分离的物质。但是,人们通常用已知标准品同时层析作为对照以鉴定被分离的样品。

大多数氨基酸在同一溶剂系统中的分配系数或 R_f 值是有差异的,这种差异主要取决于它们对溶剂的亲水性即它们的极性的不同。因此利用这种差异即可达到分离氨基酸的目的。

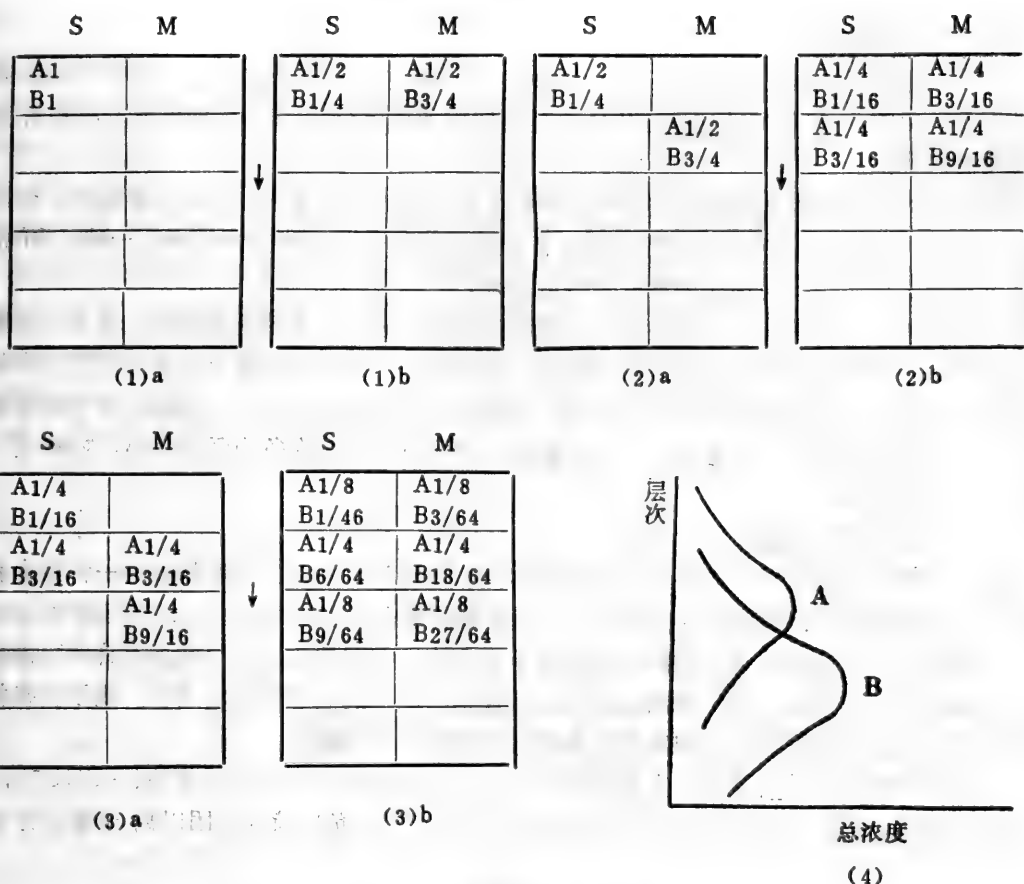


图3—5 溶质在两相中的分配

层析时，先将样品点在滤纸的一端，平衡后即可用流动相展层。至接近另一端时，可取出凉干，显色。与标准对照或测 R_f 值进行定性鉴定。根据显色后的颜色的深浅亦可作光谱定量分析。

有些氨基酸在某一溶剂系统中的分配系数或 R_f 值接近或者相同，单向层析往往不能分开，则可用双向层析或一向层析一向电泳等方法将它们分开。在双向层析中，当进行第一向层析时，样品点在滤纸的一角，展层后取出，凉干后将滤纸转动 90° ，用另一溶剂系统作第二向展层，取出凉干后显色，即可得到双向层析图谱（图3—6）。

纸上层析法也可用来分离鉴定其他物质如核苷酸、糖等。

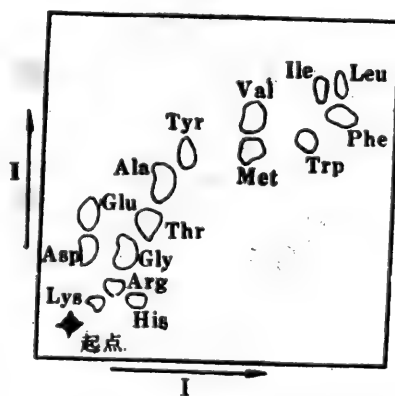


图3—6 氨基酸的双向层析图谱

溶剂 I 正丁醇：12% NH_4OH ：95% 乙醇 = 13：3：3

溶剂 II 正丁醇：80% 甲酸： H_2O = 15：3：2

2. 薄层层析法

薄层层析 (Thin-layer chromatography) 是近十多年发展起来的一种微量而快速的层析方法。目前, 氨基酸的定性分析主要是用双向薄层层析法。薄层层析兼有柱层析和纸层析两者的优点。

薄层层析以玻璃板上薄层为支持物。薄层可用纤维素、硅藻土、硅胶、氧化铝、聚酰胺或 DEAE-纤维素等涂布在玻璃板上制成。把要分析的样品滴加在薄层板的一端, 再选用适当的溶剂进行展层, 使样品中各成分得以分开。

薄层层析的基本原理, 主要根据制作薄层的原料而定。如果用的是硅胶或氧化铝等吸附剂作为薄层的原料, 则同于吸附层析的原理; 若用的是纤维素或硅藻土等作为薄层的原料, 则同于分配层析的原理; 若用的是 DEAE-纤维素作为薄层的原料, 则同于离子交换层析的原理。薄层层析除用于氨基酸的分析鉴定外, 还可用于其他许多物质的分离, 如糖类、核苷酸、各种染料等。

3. 离子交换层析法

离子交换层析法 (Ion-exchange chromatography) 是分离分析氨基酸的一种最为有效的方法。它以离子交换树脂作为支持物, 离子交换树脂是一类不溶于水、不溶于有机溶剂、不溶于酸碱的人工合成的聚苯乙烯等的高分子化合物。在它的上面共价地连有许多可解离为阴离子或阳离子的基团, 可与周围溶液中的其他相反离子或离子化合物结合。离子交换树脂根据所交换的离子类型可分为阳离子交换树脂和阴离子交换树脂。

阳离子交换树脂共价连有带负电荷的磺酸基 ($-\text{SO}_3^-$) 或带负电荷的羧基 ($-\text{COO}^-$), 前者称为强酸型, 后者称为弱酸型。 H^+ 或 Na^+ 能被这些带负电荷的基团以离子键的方式结

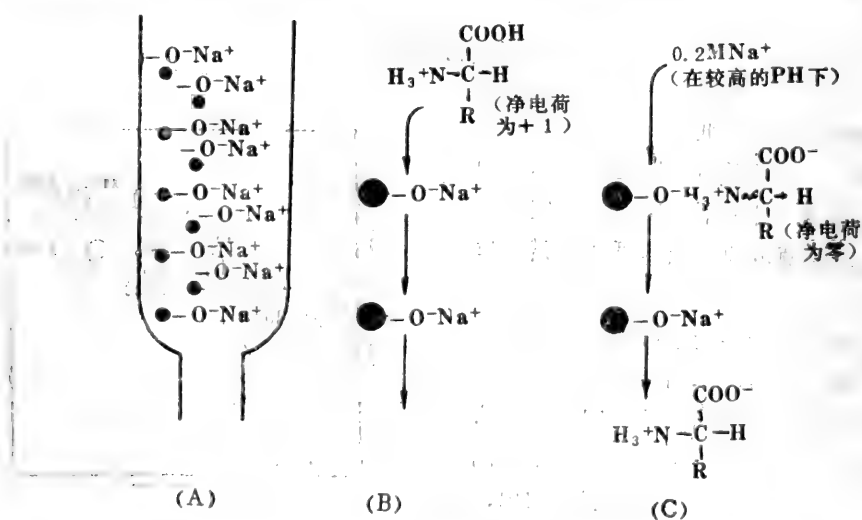


图3-7 氨基酸的阳离子交换层析

(A) 阳离子交换柱 (Na^+ 型); (B) 质子化的氨基酸与 Na^+ 交换;
(C) 洗脱, 钠离子重新取代氨基酸。

合。这些结合有 H^+ 或 Na^+ 的离子交换树脂 (前者称为 H 型, 后者称为 Na 型) 可以被其

他带阳离子的分子交换，故称为阳离子交换树脂。当把被分离的氨基酸溶液的 pH 调节至酸性时，所有的氨基酸都变成了阳离子的形式，带上了正电荷。将这种溶液通过阳离子交换树脂，带正电荷的氨基酸就会取代 H^+ 或 Na^+ 而被结合到带负电荷的 $-SO_3^-$ 基团上（图3—7）。带有两个正电荷的氨基酸(Lys 和 Arg)同阳离子交换树脂结合得最紧，中性氨基酸结合得次之，酸性氨基酸结合得较松。因此，可采用逐步提高洗脱液 pH 值和离子强度的办法将交换而被结合在树脂上的氨基酸依次洗脱下来。酸性氨基酸最先被洗脱下来，中性氨基酸次之，碱性氨基酸最后被洗脱下来。由于各氨基酸可解离的基团的 $pK'a$ 值有差异，加上树脂骨架的疏水性，用这种方法，即使很相似的分子也能被分开。Moore 和 Stein 经过长期研究，在50年代利用离子交换层析法把蛋白质中的所有氨基酸分离开了。在此基础上便设计出了氨基酸自动分析仪(Amino acid analyzer)。图3—8是按照 Moore-Stein 程序，运用氨基酸自动分析仪分离分析全部氨基酸的结果。

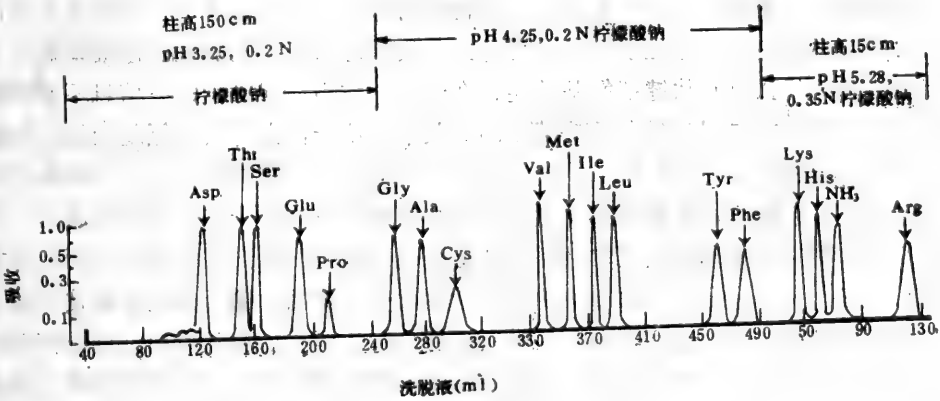


图3—8 利用氨基酸分析仪进行氨基酸离子交换柱层析回收洗脱峰

氨基酸是没有颜色的化合物，为了检查氨基酸流经交换柱的情况，可以用茚三酮显色，借此亦可以从光吸收测定出各种氨基酸的含量。由于茚三酮能同所有氨基酸反应，那么如何才能判断茚三酮阳性部分相应于哪种氨基酸呢？在同样的交换层析的条件下，某一特定的氨基酸总是在同一时间通过交换柱，并且持续的时间对每种氨基酸都是特别的。氨基酸从交换柱上洗脱下来的顺序可以借助流经柱子的每一种氨基酸接连分开的溶液体积和记下各自的洗脱时间来确定。那么，当某种氨基酸混合物被交换分离时，它们从柱下出现的顺序（即时间）是已知的。这时，只要对比混合标准氨基酸的离子交换柱层析图谱即可确定是何种氨基酸。

当蛋白质在标准条件下用 HCl 完全水解时，并不能用氨基酸分析仪（定量）分析出全部氨基酸，因为色氨酸在酸水解时被破坏，半胱氨酸也大部分受到破坏；此外，天冬酰胺和谷氨酰胺的酰胺基也被降解下来，转变成相应的天冬氨酸和谷氨酸以及铵离子。所以，这些氨基酸在洗脱图谱上并不出现。

阴离子交换树脂共价地连接有带正电荷的季胺基($-\text{N}(\text{CH}_3)_3$)或伯胺基($-\text{N}^+\text{H}_2$)等。前者属强碱型,后者属弱碱型。 OH^- 或 Cl^- 可被这些带正电荷的基团以离子键的方式结合。这些结合有 OH^- 或 Cl^- 的离子交换树脂(前者称为 OH 型,后者称为 Cl 型)可被其他带负电荷的离子或离子化合物交换,故称为阴离子交换树脂。在碱性条件下,带负电荷的氨基酸便可与 OH^- 或 Cl^- 交换而被结合到阴离子交换树脂上。氨基酸与阴离子交换树脂结合的情况刚好与阳离子交换树脂相反。酸性氨基酸结合得最紧,中性氨基酸次之,碱性氨基酸结合得较松。可用逐步降低洗脱液 pH 值的方法进行洗脱。

阴离子交换树脂不常用来分离氨基酸。

第三节 蛋白质的一级结构和一级结构测定

一、蛋白质结构导论

蛋白质是由氨基酸构成的生物大分子。生物体内存在着种类繁多、功能各异的蛋白质。虽然在本世纪30年代中期就已经了解了对所有蛋白质都通用的一些概貌:已经知道了各种氨基酸的结构,并已经认识到肽键把氨基酸连接在一起的作用。但是,这些信息不能解释蛋白质之间的差别,或这些差别与蛋白质功能之间的关系。第一,蛋白质的氨基酸组成和氨基酸顺序与它的空间构象有何关系?第二,更为重要的问题是蛋白质的结构与它的特殊的生物功能之间有什么关系?如何才能使抗体、激素、酶或结构蛋白这样一些不同蛋白质足以行使不同的功能?在核糖核酸酶和血红蛋白之间,什么样的差别使前者产生酶促活性而使后者成为运输蛋白?第三,为什么有些蛋白质的功能会发生改变?例如,镰刀形红细胞贫血病患者产生了一种不能正常携带氧的血红蛋白,这种血红蛋白同正常人的血红蛋白之间有何差别?

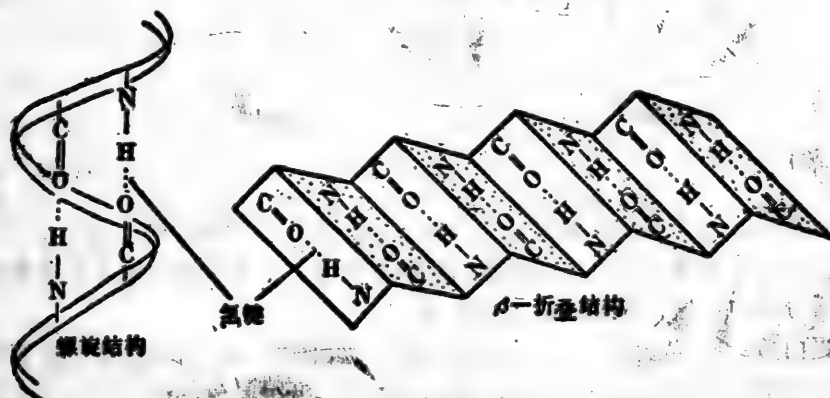
上述问题只有通过分析和比较蛋白质的氨基酸顺序和蛋白质分子的空间构象之后才能得到回答。事实上,分子生物学家们通常都是借助蛋白质氨基酸顺序的资料和X-射线晶体衍射所获得的数据去揭示蛋白质结构与功能之间的关系的。

根据对不同种类、不同形状、不同功能的蛋白质结构的研究,总的来说,蛋白质的结构水平可分为四级,即一级、二级、三级和四级结构。一级结构(或称化学结构)即初级结构,它涉及蛋白质分子的氨基酸组成和氨基酸顺序。在这种结构水平上,共价肽键是唯一的键合方式。二级结构是指蛋白质多肽链主链在空间中的走向,或有规则的空间排列,是主链的构象,不涉及侧链基团间的相互关系。三级结构是指蛋白质在二级结构的基础上进一步在三维空间中沿多个方向卷曲、折迭成很不规则的特定构象。它不仅涉及主链的构象,而且还涉及侧链的构象。对单链蛋白质来说,三级结构就是它的空间结构;对由共价键(二硫键)连接而成的多链蛋白质来说,三级结构是指各组成链的各自的空间结构。四级结构是指寡聚蛋白质分子中亚基(或称亚单位)之间的相互关系或空间位置。但每个亚基有自己的一级、二级和三级结构。

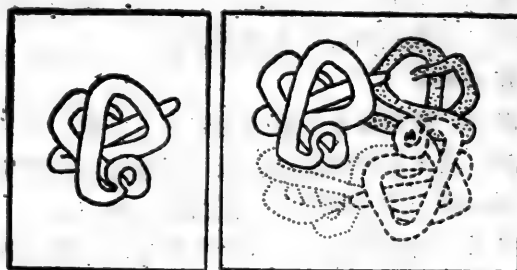
蛋白质的二级、三级和四级结构统称为蛋白质的空间结构或空间构象或高级结构。

Ser—Tyr—Ser—Met—Glu—His—Phe—Arg—Trp—Gly—Lys—Pro—Val—Gly—Lys
 Glu—Asp—Glu—Ala—Gly—Asn—Pro—Tyr—Val—Lys—Val—Pro—Arg—Arg—Lys
 Ser—Ala—Glu—Ala—Phe—Pro—Leu—Glu—Phe

(a) 一级结构



(b) 二级结构



(c) 三级结构

(d) 四级结构

图3—9 蛋白质的结构水平示意图。(a)一级结构，
 (b)二级结构(螺旋结构和 β -折叠结构)，
 (c)三级结构；(d)四级结构。

二、蛋白质分子的主链结构

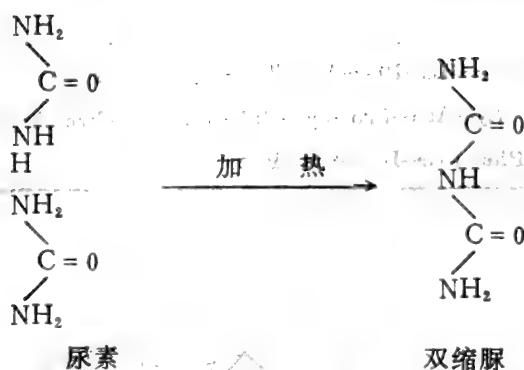
1. 肽键(peptide bond)

肽键决定蛋白质的基本结构的观点首先是由 Fischer 和 Hofmeister 于1902年提出来的，当时他们的主要依据是：

①本来蛋白质分子中自由存在的 α -氨基和 α -羧基是很少的，但是当蛋白质被水解时，自由的 α -氨基和 α -羧基呈现等量增加。这表明氨基酸中的 α -氨基和 α -羧基在构成蛋白质时参与了结合，而当蛋白质水解时，这种结合又重新断开，产生 α -氨基和 α -羧基。

②能够水解蛋白质的酶也能水解人工合成的二肽和三肽（其后合成的多肽也能被蛋白酶水解）。

③蛋白质分子能同碱性硫酸铜产生双缩脲反应(diuret reaction)。双缩脲是由两分子的尿素经过加热放出一分子 NH_3 而得到的产物。当向加热得到的双缩脲中加入氢氧化钠及



少量稀硫酸铜溶液后，产生复杂的紫红色化合物。这是由于双缩脲含有（两个） $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ （酰胺键）的缘故。天然蛋白质也有很强烈的双缩脲反应，这说明蛋白质是含有酰胺键的化合物。在蛋白质分子中，这种酰胺键即称为肽键。

60年代，蛋白质的人工合成以及人工合成的肽和蛋白质的 X- 射线晶体衍射图案的结果使肽键决定蛋白质的基本结构这一论点进一步得到证实，肽键是氨基酸之间的主要共价键。这一观点经过实践证明已为人们所公认。

2. 肽和肽键

一个由两个氨基酸分子组成的肽称为二肽，其中含有一个肽键。由于二肽结构中只有一个肽键，故不呈现双缩脲反应。若用双缩脲反应来判断蛋白质水解程度，则在呈现阴性反应之后还应再水解一段时间才认为蛋白质水解完全。

三肽由三个氨基酸组成，含两个肽键。多肽一般可视为由三个以上的氨基酸组成，其肽键数目应为氨基酸个数减一。多肽的线性结构即称为肽链(peptide chain)。组成肽链的氨基酸因参与了肽键的形成，不是完整的氨基酸，故称之为氨基酸残基(amino acid residue)。

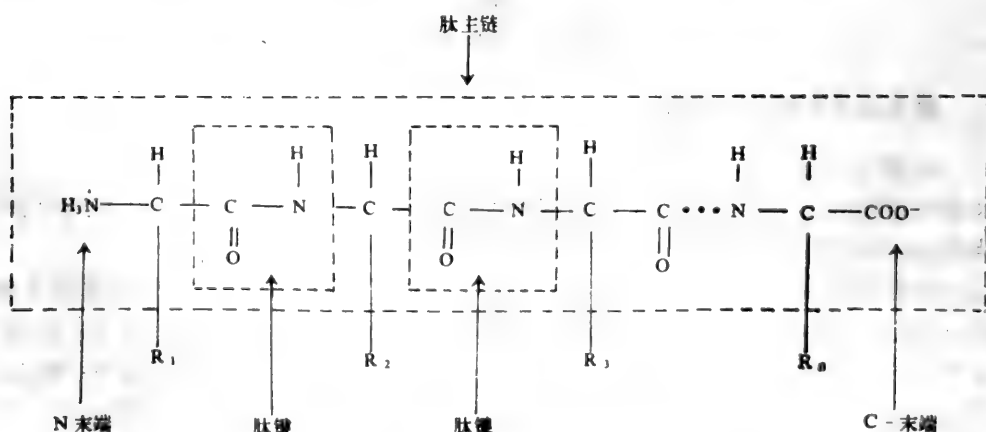


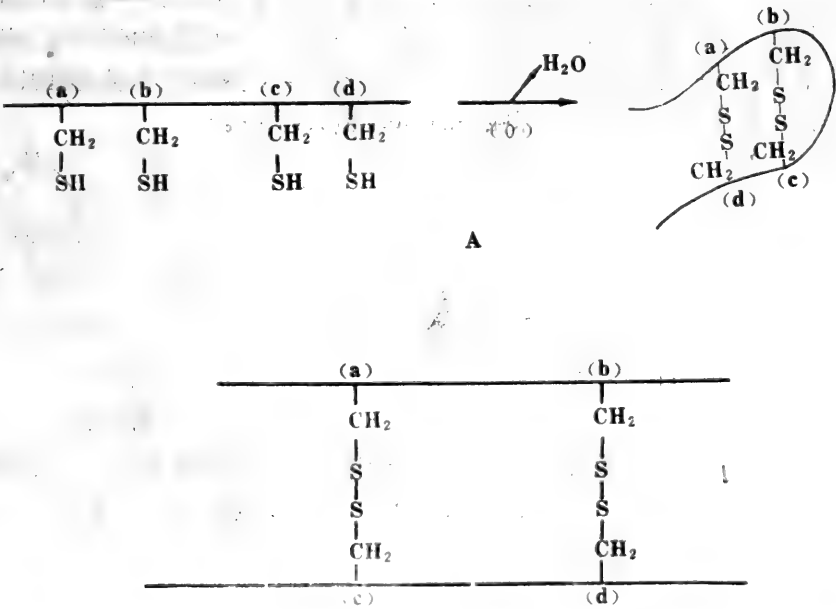
图3—10 蛋白质多肽链的模式结构

在书写肽链结构时，按照习惯将含有自由 α - 氨基的氨基酸一端写在左边，这一端称为氨基

末端或 N- 末端；把含有自由 α - 羧基的氨基酸一端写在右边，这一端称为羧基末端或 C- 末端（如图3—10所示）。

从图3—10可以看出，①蛋白质中的肽键都是通过一个氨基酸的 α -羧基同另一个氨基酸的 α -氨基脱水缩合而成的；②每种蛋白质都有相同的肽主链 (backbone of peptide)，而各种蛋白质之间的差别即结构和功能的不同则是由每种蛋白质的氨基酸组成和氨基酸数以及这些氨基酸在蛋白质多肽链中的排列顺序决定的。这就是说，虽然不同的蛋白质有相同的主链，但是，氨基酸顺序的差别则意味着从主链伸出的侧链 R 基的性质和顺序对于每种蛋白质来说是特异的。各种氨基酸的 R 基团有不同的物理和化学性质：不同的大小、不同的电荷、对水的不同亲和力等等。我们可以设想一下，一个含有200个甘氨酸分子的蛋白质和一个由1000个赖氨酸分子组成的蛋白质之间的差别。这个全甘氨酸的蛋白质很短很小，仅有一个氢原子作为 R 基团从主链上伸出来，在生理 pH 溶液中，这个蛋白质的净电荷为零。另一方面，全赖氨酸的蛋白质有1000个庞大的 R 基团，且每个 R 基团在生理 pH 下都带有一个正电荷，这些正电荷趋于彼此排斥。很清楚，尽管这两种蛋白质有相同的肽主链，但它们是两种不同的分子。

当氨基酸参入到肽链中去后，它们的 α -氨基和 α -羧基被束缚在肽键中。这些被键合的基团不再有自由 α -氨基和自由 α -羧基的化学反应，它们也不再能供出和接受氢离子，并且它们不能再为蛋白质贡献电荷，每一条肽链（无论多长）仅有一个自由的 α -氨基和一个自由的 α -羧基，它们分属于大分子两端的两个氨基酸。



3—11 二硫键。A.链内二硫键；B.链间二硫键

当然，所有的蛋白质都是由多肽链构成，但不是所有具有生理活性的多肽都叫做蛋白质。虽然蛋白质与分子量较大的多肽之间并没有严格的界线，但一般分子量超过 5000 的氨基酸聚合物（约40个以上氨基酸残基）就应称作为蛋白质。分子量比这小的，例如多肽激

素，通常应叫做多肽。

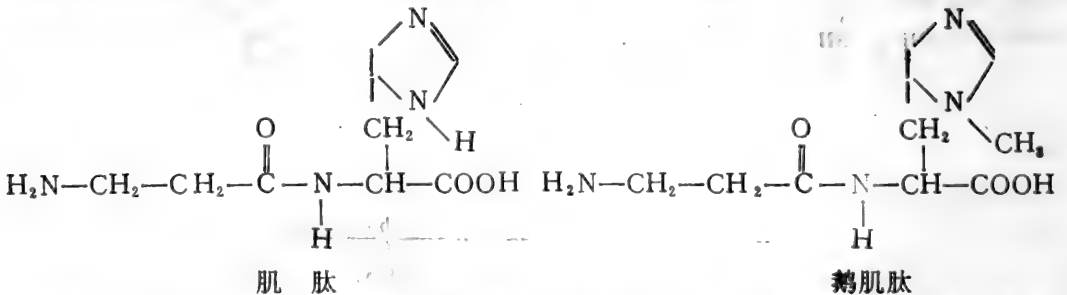
肽键构成了蛋白质分子多肽链的主链结构，但肽键并不是蛋白质分子中的唯一共价键。另一种共价键是二硫键(disulfide bridge)。二硫键是由肽链中的两个半胱氨酸残基的侧链巯基(-SH)通过氧化脱氢形成的。二硫键可以把不同肽链连接起来，例如胰岛素分子的A、B两条肽链即是经二硫键连接；二硫键也可以把同一条肽链的不同部分连接起来，例如核糖核酸酶即是如此。二硫键在蛋白质分子中起着稳定肽链空间构象的作用，往往与生物活性有关。

生物体内的许多蛋白质都是由两条或多条肽链构成的。除有些蛋白质是由二硫键把不同肽链连接在一起外，大多数蛋白质的多肽链之间是通过非共价键联系在一起的，肽链和肽链间的结合力比较弱，因而比较容易把它们拆开。在这类蛋白质分子中，每条肽链构成一个亚基(或称亚单位，subunit)，由亚基构成的蛋白质就称为寡聚蛋白(oligomeric protein)。催化代谢反应的许多酶都属于寡聚蛋白。

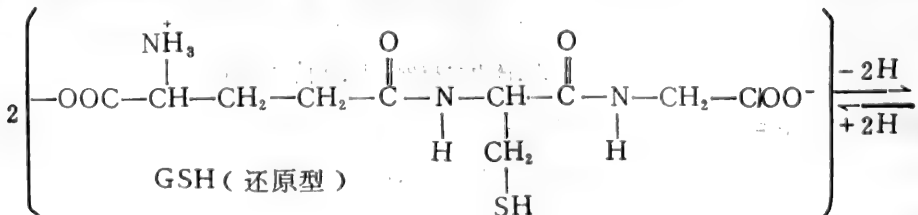
三、天然出现的非蛋白质的肽类

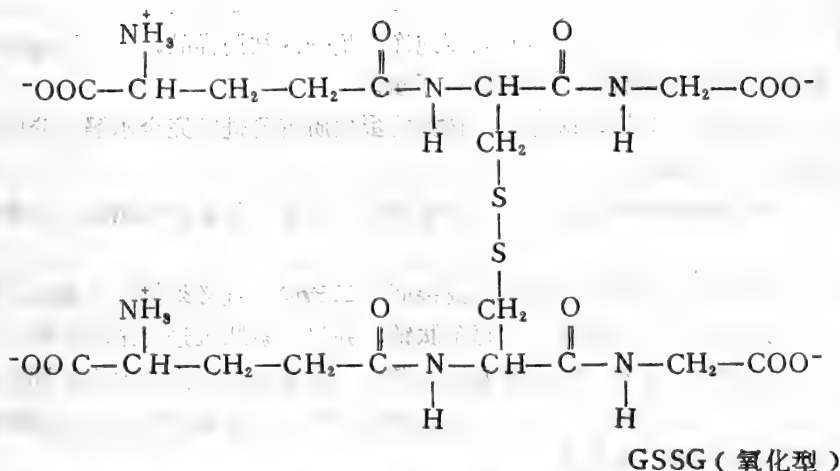
几乎在所有生物类型中都可以发现和找到许多种非蛋白质肽。这些肽类物质都有相应的生物活性，尽管我们并不完全清楚它们的功能。一般我们把这些肽类物质统称为生物活性肽。生物活性肽在组成、结构和大小方面存在很大的差异。有的呈环形，有的有分枝，有的还含有D-氨基酸。

从动物肌肉组织中(包括人体肌肉组织)分离出了两种最小的肽——肌肽(carnosine)和鹅肌肽(anserine)，它们都是二肽。前者是由β-丙氨酸(α-丙氨酸的结构异构体)和组氨酸构成，后者是由β-丙氨酸和含有甲基的组氨酸组成。这两种肽在肌肉组织中可能起生理缓冲剂的作用，因为它们的组氨酸咪唑基的pK_a值大约是6。



谷胱甘肽(glutathione)是生物体内普遍存在的一种三肽，它是由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸构成的。谷氨酸的γ-羧基而不是α-羧基参与肽键的形成。由于谷胱甘肽分子中含有巯基，因此该肽具有还原型和氧化型两种形式。





谷胱甘肽的主要生理功能表现在：①参与氨基酸跨膜转运，②作为清除剂与有害的氧化剂作用保护含巯基的蛋白质，③维持血红蛋白铁原子的二价(Fe^{2+})还原态。此外，它还可以作为一种电子传递体参与植物体内的电子传递。

许多抗菌素也是肽类物质。例如短杆菌肽 S (gramicidin S) 和杆菌肽 A (bacitracin A) 属于此类，它们都是具环状结构的多肽，且含有 D-氨基酸以及一般不出现在蛋白质分子中的鸟氨酸。

一些激素也是肽类，例如催产素、加压素、生长激素抑制素、血管紧张素等等。此外，一些神经递质如脑啡肽也是肽类物质。

四、蛋白质一级结构的测定 (Determination of the primary structure)

蛋白质一级结构的测定是指蛋白质分子中氨基酸排列顺序的测定。1953年，Sanger 等人经过将近10年的努力，首先完成了牛胰岛素的氨基酸顺序的测定。现在约有 1500 种蛋白质和肽激素完成了一级结构的测定。尽管有了这样重大的成就，但这只是代表细胞中所发现的一少部分。

虽然蛋白质的氨基酸组成相对比较容易获得，但是这些数据未能提供关于蛋白质氨基酸顺序的实际资料，没有指导蛋白质氨基酸线性顺序的规律。任何一种氨基酸都能同另外一种氨基酸连接，大多数多肽链中的氨基酸顺序没有周期性或重复单位。就一种蛋白质的氨基酸组成试图推断出它的氨基酸顺序而论，那么各种可能性都是存在的。换句话说，仅仅知道某种蛋白质的氨基酸组成是不可能排列出它的氨基酸顺序的。

根据在蛋白质氨基酸顺序测定中已经使用过的方法，可以把蛋白质氨基酸顺序的测定归纳为下述内容：应用两种或两种以上的专一性水解方法，分别将蛋白质多肽链切断，各自得到一系列大小不同的肽碎片 (fragment)，然后将这些肽碎片分别分离纯化，测定它们的氨基酸排列顺序，把得到的两套或两套以上的肽碎片的氨基酸顺序拼凑起来，就可以得到该蛋白质多肽链的一级结构，即全部氨基酸排列顺序。

要完成某种蛋白质的氨基酸顺序测定，大致要经过以下几方面的程序。

①首先要获得高度纯净的蛋白质样品。被测蛋白质样品中必须没有其他的大分子，尤其不能含有其他任何杂蛋白。如果不能得到高度纯净而均一的被测样品，要想测定蛋白质的一级结构是没有意义的。纯化的样品还应测定分子量。

②蛋白质的氨基酸组成分析。即是说，被测的蛋白质需要进行完全水解，分析其氨基酸组成及各氨基酸的克分子数。

③在着手进行氨基酸顺序测定之前必须确定该蛋白质是由几条肽链组成，即需要进行末端分析。

④如果确知在蛋白质分子中存在链内的或链间的二硫键，就必须拆开二硫键，从而获得伸展的肽链。如有几条肽链，则需分离出每条肽链，并对每条肽链进行末端分析。

⑤采用两种或两种以上的专一性水解方法，得到两套或两套以上的大小不同的肽链的碎片，并分离各套碎片。一旦获得单一的碎片，就需要分析它们的氨基酸组成和末端氨基酸。

⑥测定每个肽碎片的氨基酸顺序。

⑦比较两套或两套以上的碎片的氨基酸顺序，拼凑出整个肽链的氨基酸顺序。

⑧确定二硫键和酰胺基的位置。

为了突出蛋白质一级结构分析中的几个基本环节，故不在此介绍蛋白质及氨基酸分离纯化和分析的方法，这些内容已分散到本章的有关部分介绍。在这里，仅就与蛋白质的氨基酸顺序测定直接相关的几个问题加以说明。

1. 氨基酸组成分析

氨基酸组成分析是蛋白质多肽链氨基酸顺序分析中不可缺少的一环。它包括蛋白质的完全水解、氨基酸种类分析和每种氨基酸的数目测定。蛋白质完全水解的标准方法是：用重蒸的 6.0mol/L 盐酸于 $100-120^\circ\text{C}$ 下，在真空安培瓶内进行。水解的时间大约20小时左右。水解后除去过量的盐酸。所得到的氨基酸不消旋，但色氨酸被破坏，半胱氨酸、丝氨酸和苏氨酸也有不同程度的损失。此外、天冬酰胺、谷氨酰胺的酰胺基被降解下来，转变成相应的天冬氨酸和谷氨酸以及铵离子。由于色氨酸对酸不稳定而对碱稳定，所以一般用碱水解来测定肽链中的色氨酸。

近年来，已应用甲基磺酸（methanesulfonic acid, $\text{CH}_3\cdot\text{SO}_3\text{H}$ ）代替盐酸水解蛋白质，现已成为普遍使用的方法，因为它不会引起色氨酸的破坏。

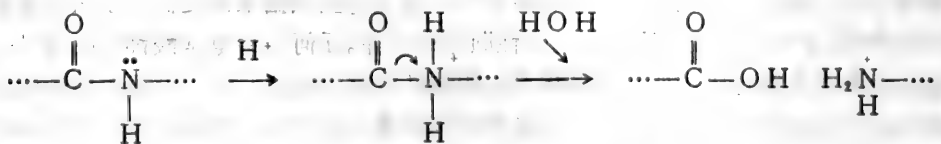


图3-12 蛋白质的酸水解机制

水解后得到的氨基酸混合物可用电泳法或离子交换法进行分离、鉴定，并测定每种氨基酸的量。蛋白质的氨基酸组成可以用每克分子蛋白质含有多少克分子的某氨基酸残基，或者以每100克蛋白质中含有多少克某氨基酸残基来表示。氨基酸分析仪只需几小时就可以测定一种蛋白质的全部氨基酸组成。

2. 末端分析

在测定蛋白质的氨基酸顺序之前需要确定该蛋白质是几条肽链组成的，这就需要对蛋白质进行末端分析。此外，若已确定蛋白质含有几条肽链并把它们分开之后，每条肽链的末端尚须分析。

蛋白质多肽链的数目可以从测定每分子蛋白质所含 N-末端氨基酸残基的数目推导出来。显然，每分子的蛋白质所含的 N-末端氨基酸的残基数目应与它的肽链数目相等。

(1) N-末端分析

①二硝基氟苯法：前面我们已经介绍过二硝基氟苯可以和氨基酸的 α -氨基或肽链 N-末端游离的 α -氨基起反应，生成二硝基苯氨基酸 (α -DNP-AA) 或二硝基苯多肽，由于

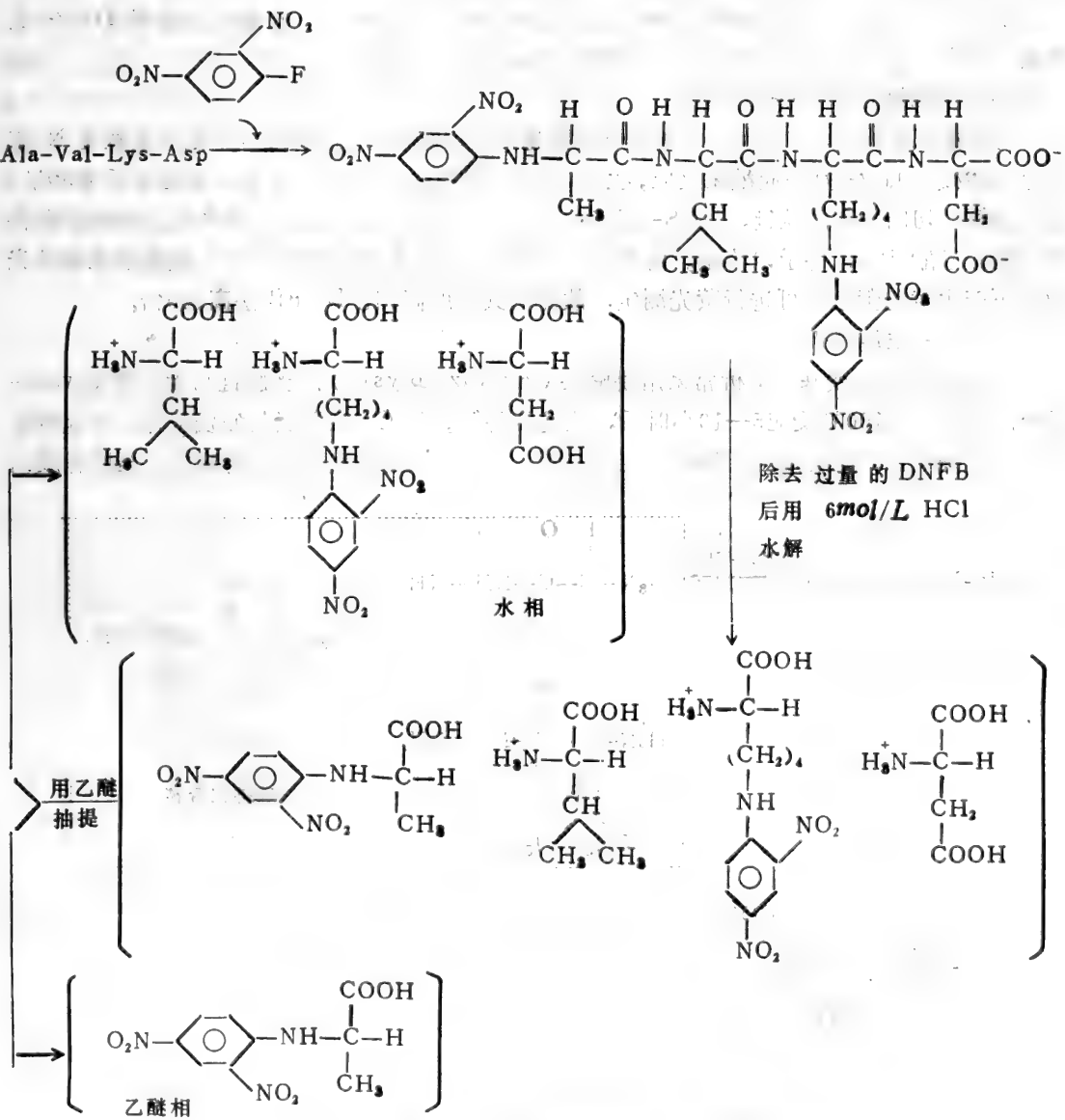


图3-13 二硝基氟苯法

游离的 α -氨基和二硝基苯之间形成的键对酸是稳定的，不被酸水解，所以当多肽链 N-端氨基酸残基的游离 α -氨基同二硝基苯起反应生成 DNP-多肽后，用 6mol/L 盐酸水解处理，肽链中的所有肽键均被打断，唯有 DNP-基仍连在 N-末端的氨基酸残基上，形成黄色的 α -DNP-氨基酸。由于 α -DNP-氨基酸在酸性溶液中不带正电荷，而其他氨基酸和 ϵ -DNP-赖氨酸（肽链中的赖氨酸的 ϵ -氨基亦能与 DNFB 反应，水解后也生成黄色的 ϵ -DNP-赖氨酸），因在酸性条件下带正电荷，故用乙醚进行抽提时，可把由 N-末端产生的 α -DNP-氨基酸从酸水解液抽提到乙醚相中，而其余的则留在酸水解液中（见图3—13）用乙醚抽提得到的 α -DNP-氨基酸可用层析法加以鉴定。

肽链中的其他 R 基团如酚基，咪唑基等也能与 DNFB 作用，水解后也生成 DNP-氨基酸，但由于它们在水解液中均带正电荷，所以不能被乙醚抽提。

②丹磺酰氯（DNS-Cl）法

丹磺酰氯（Dansyl Chloride）是一种荧光试剂，它能与氨基酸的 α -氨基或肽链 N-末端氨基酸残基的 α -氨基起酰化反应，生成 DNS-氨基酸或 DNS-多肽。反应之后 6mol/L 盐酸水解，切断所有的肽键，DNS-氨基酸之间的连接键对酸稳定，不被水解。在酸性条件下用醋酸乙酯抽提，并予以鉴定。由于 DNS-Cl 是一种荧光试剂，DNS-氨基酸在紫外光激发下产生黄色萤色，可进行萤光测定，故此法灵敏度高，比 DNFB 法高 100 倍。

（2）C-末端分析

C-末端氨基酸残基的分析常采用胍解法（hydrazinolysis）。当肽链与无水胍（hydrazine，联氨）在 100℃ 反应 5—10 小时后，肽键被胍解。除 C-末端氨基酸残基外，其他所有的氨基酸残基都转变成相应的酰胍化合物，C-末端的氨基酸残基则以游离的氨基酸释放出

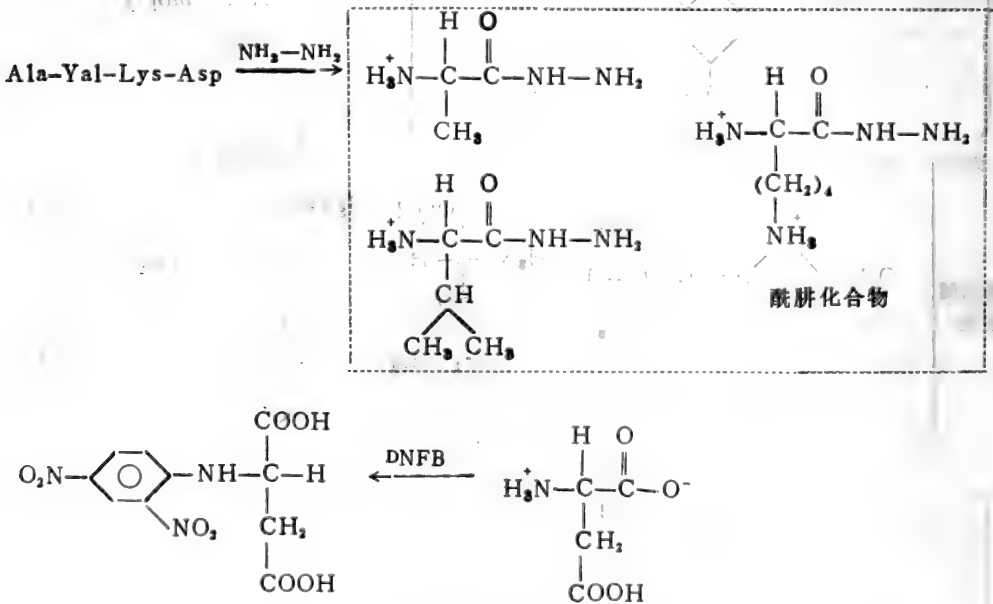


图3—14 胍解法测定 C-末端氨基酸

来(因为 C-末端残基的 α -羧基是游离的, 没有参与肽键的形成, 故不能被酰肼化)。氨基酸的酰肼化合物可与苯甲醛缩合成水不溶物(二苯基衍生物), 可用离心法使其与水溶性的 C-末端氨基酸分开。留在水中的 C-末端氨基酸同 DNFB 试剂反应, 生成 DNP-氨基酸, 用乙醚抽提后, 可用层析法鉴定, 即可确定 C-末端的氨基酸(图3-14)。

3. 拆开链间的或链内的二硫键

若多肽链之间或者多肽链内存在二硫键, 在测定肽链的氨基酸顺序之前必须把二硫键拆开, 以获得伸展的肽链, 这样才能进行氨基酸顺序测定。最常用的拆开二硫键的方法是还原法和氧化法。

(1) 还原法

用过量的巯基乙醇(mercaptoethanol)或二硫苏糖醇(dithiothreitol, 简称 DTT)等巯基化合物可使二硫键拆开而被还原为半胱氨酸残基的巯基($-SH$)。由于半胱氨酸的巯基在有空气的条件下, 在 pH 大于 7 时不稳定, 容易被氧化。所以需要对巯基加以保护, 以防止它重新氧化。常用的保护剂是碘乙酸。碘乙酸使巯基转变为 S-羧甲基衍生物。肽链水解时半胱氨酸残基以 S-羧甲基半胱氨酸的形式出现, 它很容易用层析方法鉴定出来。

(2) 氧化法

常用过甲酸($CHOOH$)作为氧化剂, 使二硫键氧化生成半胱氨磺酸。

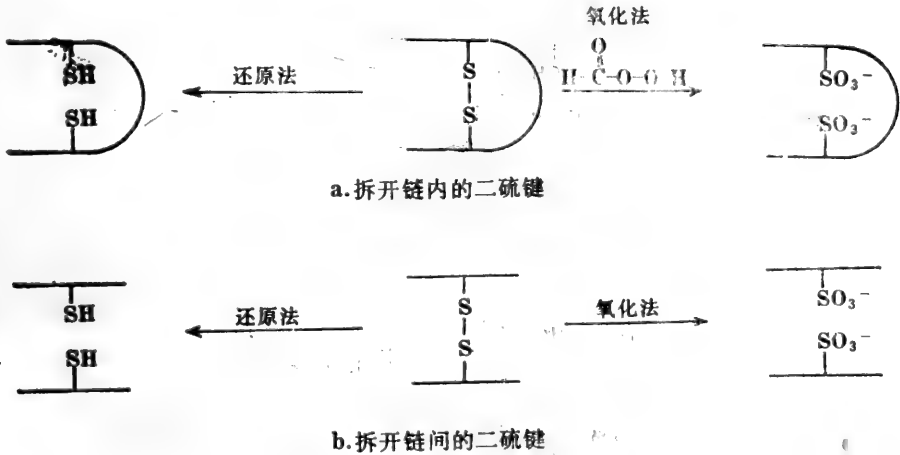


图3-15 二硫键的拆开

一旦拆开链间的二硫键, 接着就需要进行肽链的分离。常用的方法有柱层析法、区带电泳法。肽链分开之后, 尚须测定它们的氨基酸组成并进行末端分析。

4. 肽链的部分水解(Partial hydrolysis)

目前尚无从完整的多肽链的一端一个一个地切下氨基酸进行顺序分析的方法, 必须将完成的肽链降解成大小不同的、适合做顺序分析的肽碎片。为了便于最后确定完整肽链的氨基酸顺序, 一般至少需要采用两种不同的部分水解的方法。

为了产生有意义的的数据, 选择降解蛋白质的方法必须是高度再现的。即是说, 当用某种方法作用于某一特定的蛋白质或多肽时, 每次都应产生同样的一套碎片, 同时还应产生易于

处理的长度(5—20个氨基酸残基)。所用的每种方法都应保证产生一套不同于它者的碎片。常用的方法有胰蛋白酶法、胰凝乳蛋白酶法以及溴化氰法。

胰蛋白酶 (Trypsin) 是一种内肽酶 (endopeptidase), 能使肽链中的碱性氨基酸 (赖氨酸和精氨酸) 羧基端同其他氨基酸的氨基所成的肽键水解。所以, 用胰蛋白酶降解肽链后所产生的肽碎片的 C- 末端是赖氨酸或精氨酸。若赖氨酸和精氨酸的羧基端是脯氨酸或羟脯氨酸, 则不能被该酶水解。

胰凝乳蛋白酶 (Chymotrypsin, 又称糜蛋白酶) 也是一种内肽酶, 主要作用于芳香族氨基酸 (苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸) 羧基端的肽键, 产物的羧基端往往是芳香族氨基酸。

金黄葡萄球菌 V8 蛋白酶 (S aureus V8 protease) 作用于肽链内的谷氨酸残基的羧基端的肽键, 在某些条件下也能作用于天冬氨酸残基的羧基端肽键。

溴化氰 (Cyanogen bromide) 是肽链部分解水的一种较为理想的化学试剂。它能作用于肽链中甲硫氨酸的羧基端的肽键, 其专一性强, 切点少, 可以从肽链中的甲硫氨酸残基的数目估计出用此法降解产生的肽碎片的数目。用溴化氰处理后, 甲硫氨酸转变成成为 C- 末端的高丝氨酸内酯 (图3—16)。

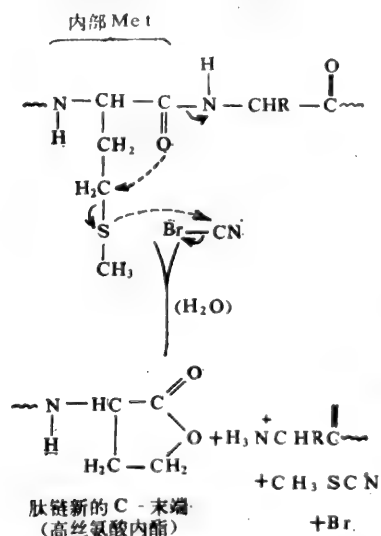


图3—16 溴化氰(BrCN)作用机制

图 3—17 是一个典型的多肽, 用胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和溴化氰三种不同的方法分别水解的结果。

用上述任何一种方法降解一完整的蛋白质约产生 20--30 个左右大小不同的肽碎片。这些碎片在测定其氨基酸组成和顺序之前必需加以分开。由于混合物中的这些肽碎片都有不同的氨基酸组成, 它们在总的电荷方面是有差别的。所以, 可通过电泳的方法把它们分开。一个肽碎片的总电荷是它的侧链 R 基团的正负电荷加上末端氨基和羧基电荷的总和。当然, 这种总电荷有赖于环境 pH 值。由于在实际情况下, 肽碎片的数目和组成是不知道的, 所以, 混

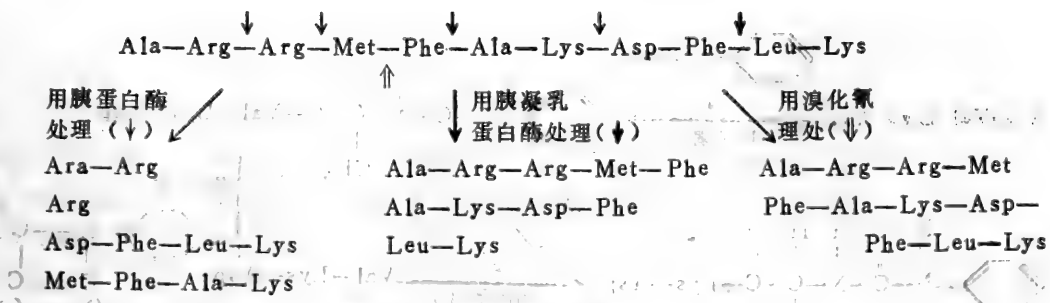


图3-17 肽链部分水解

合物通常是在不同的 pH 下电泳，以便找出 混合物解析成最多数目的碎片的条件。例如用胰凝乳蛋白酶降解上述多肽得到三个产物的电荷随 pH 的变化而改变（表3-3），只有在 pH7 下通过电泳才能把它们完全分开。

表3-3 肽碎片的总电荷随 pH 改变

肽 碎 片	总电荷的变化		
	酸性pH	pH7	碱性pH
Ala-Arg-Arg-Met-Phe	+ 3	+ 2	- 1
Ala-Lys-Asp-Phe	+ 2	0	- 2
Leu-Lys	+ 2	+ 1	- 1

5. 肽碎片的氨基酸顺序测定

(1) Edman 降解法

Edman 发展了一种很有用的方法。他用苯异硫氰酸（Phenylisothiocyanate）在弱碱性条件下，与肽链 N—末端的游离 α -氨基起反应生成苯氨基硫甲酰基衍生物（Phenylthiocarbamonyl derivative），即 PTC-多肽。除去过量的试剂，用弱酸溶液温和地处理即可释放出 N-末端的环状衍生物——氨基末端残基的乙内酰苯硫脲（Phenylthiohydantoin）氨基酸（PTH-氨基酸）。用醋酸乙酯抽提出 PTH-氨基酸并加以鉴定，即可确知 N-末端的氨基酸是何种氨基酸。由于用弱酸处理，条件温和，不会打断肽链中的其他肽键。因此，上述反应的第二个产物（即 N—末端少了一个氨基酸的肽链）被分离之后，可以重复上述反应。这个方法就叫故 Edman 降解法（见图3-18）。由此可见，Edman 降解法不仅可以用来测定 N—末端的氨基酸残基，而且更为有意义的是它能从 N—端开始，一个一个地把氨基酸残基切割下来，从而构成了蛋白质氨基酸顺序分析的基础。目前使用的氨基酸顺序仪就是这个方法的自动化的应用，一次可以测定由50—60个氨基酸残基组成的多肽的氨基酸顺序。若将 Edman 降解法和 DNS 法结合起来。则可进一步提高分析的灵敏度。

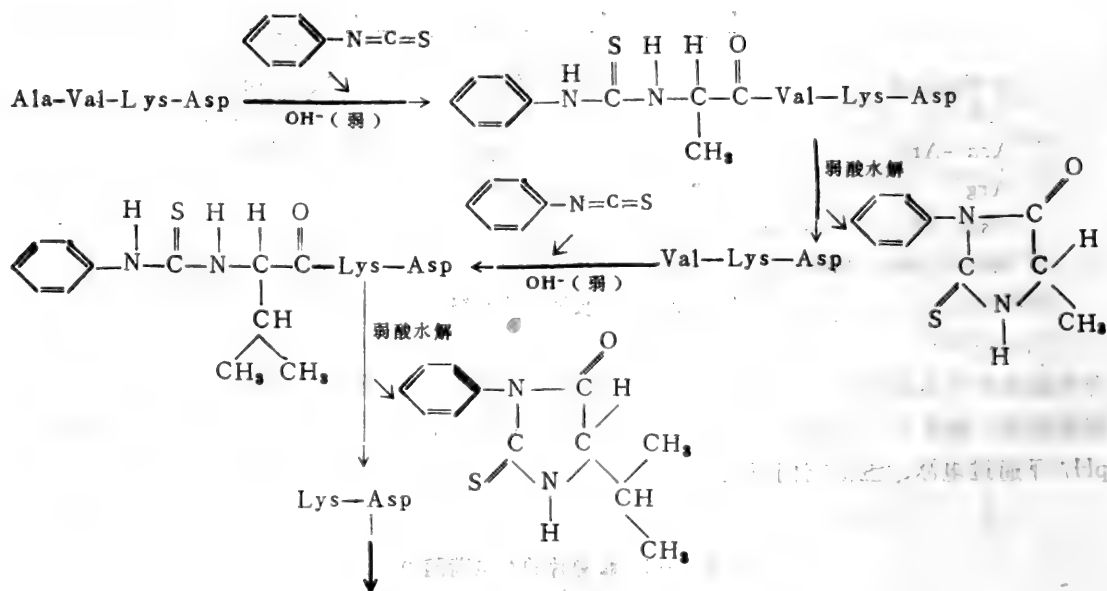


图3-18 Edman 降解

(2) 羧肽酶法

羧肽酶 (carboxypeptidases) 是一组外肽酶 (exopeptidase), 已发现有 A、B、C 三种, 它们都能从蛋白质或多肽的 C-末端将氨基酸依次水解下来。它们作用的专一性有所不同。羧肽酶 A 是常使用的一种工具酶, 它对 C-末端为芳香族氨基酸和侧链基团较大的脂肪族氨基酸具有较强的亲和力。若 C-末端残基是这样的氨基酸则最容易被水解下来。除对 C-末端为赖氨酸、精氨酸、脯氨酸无作用外, 对 C-末端为其他氨基酸残基所成的肽键也能水解。水解下来的氨基酸分离出来后可用层析或电泳等方法加以鉴定, 由此可确定 C-末端为何种氨基酸。羧肽酶 A 能继续水解缩短了一个残基的肽链的新的 C-末端氨基酸残基。如此重复下去, 可以将 C-端的氨基酸残基按顺序水解下来。羧肽酶 B 能水解 C-末端的赖氨酸和精氨酸残基, 不作用于脯氨酸。如果 C-末端第二个氨基酸是脯氨酸, 则羧肽酶 A 和 B 对任何 C-末端氨基酸都不起作用。羧肽酶 C 能水解 C-末端的脯氨酸, 对其他氨基酸残基水解速度慢。若能结合使用这一组羧肽酶, 在一定条件下可较好地测定 C-端氨基酸顺序 (图3-19所示)。

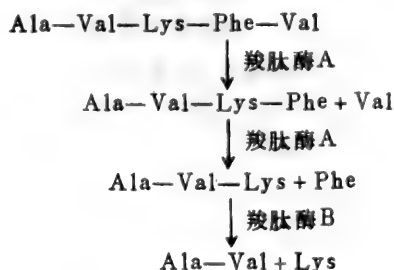


图3-19 用羧肽酶测定 C-端氨基酸顺序

但是，在实际应用中，这个方法不可能这样流畅地进行。这类酶不会这样简单地除去C端的一个氨基酸之后就停止工作，而让研究者分离出自由的氨基酸和缩短了的多肽。随着水解的进行，水解速度会有某些变化。因为新的C-末端形成之后，酶或是水解这个新的C-端残基或是使另外一个完整肽链的C-末端残基水解。如果第二个残基被水解的速度比第一个残基水解的速度大得多，那么，这两个残基几乎同时被释放。随着反应的进行，反应产生的混合物太复杂，以致不能产生有效的数据去判断它们的先后顺序。

与羧肽酶作用方向相反的一组外肽酶是氨肽酶 (Aminopeptidases)。氨肽酶是专门作用于N-末端氨基酸残基的，同羧肽酶一样，也可以在一定条件下把N-末端的氨基酸依次切割下来。精氨酸氨肽酶是其中常用到的一种酶。这个酶并不只作用于N-末端的精氨酸残基，而且也作用于N-末端其他的氨基酸残基，只不过水解的速度有所不同罢了。因此，也象羧肽酶一样，有时不能获得准确的信息。

6. 用片段重叠法确定整个肽链的氨基酸顺序

一个小肽链的氨基酸顺序我们可以用Edman降解法或Edman降解法与羧肽酶法相结合来确定。但是，一个较大的肽链或一个完整的多肽链的氨基酸顺序如何确定呢？现在我们用图3-17中的多肽来说明片段重叠法在多肽链的氨基酸顺序确定中的运用。所谓片段重叠法系指比较两套或两套以上的肽碎片的氨基酸顺序，根据它们的重叠情况，推导出整个肽链的全部氨基酸顺序。

假定已知图3-17中的多肽的氨基酸组成，并且鉴定出了N-末端和C-末端的氨基酸分别是丙氨酸 (Ala) 和赖氨酸 (Lys)。假定这个分子首先用胰蛋白酶降解成四个小肽。这四个肽经Edman降解法处理测定了它们的氨基酸顺序。这四个小肽是：

Arg

Ala-Arg

Asp-Phe-Leu-Lys

Met-Phe-Ala-Lys

但是光凭这一组数据是不能决定这四个片段的前后顺序。虽然N-末端可以确定，但C-端小肽究竟是哪一个，则不能肯定，再者，游离的精氨酸的位置也无法确定。

若上面的这个肽用胰凝乳蛋白酶处理，可以产生三个小肽。用Edman降解法测定了它们的氨基酸顺序。这三个小肽是：

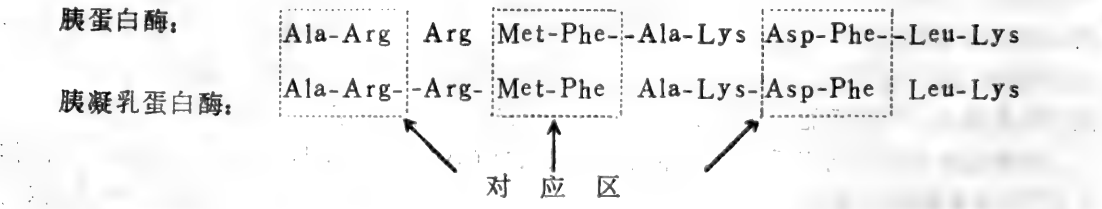
Ala-Arg-Arg-Met-Phe

Leu-Lys

Ala-Lys-Asp-Phe

仅凭这一组数据亦不能推导出这三个片段的前后顺序。只有把上两组数据结合起来考虑，才能拼凑出该肽链完整的氨基酸顺序。在每一套碎片中只出现一次的顺序如，Ala-Arg、Met-Phe、Asp-Phe，必定源于最初分子的同部位（即它们必定会重叠）。另外，在最初分子中只含有一个Met和一个Asp，因此，这两个氨基酸在上述两套碎片中的位置也必

定相对应。应用这种推理，由这两套碎片的氨基酸顺序就可以推导出最初分子的全部氨基酸的顺序



总顺序: Ala-Arg-Arg-Met-Phe-Ala-Lys-Asp-Phe-Leu-Lys
 对于那些分子量很大的蛋白质，碎片的数目可能很多，但是只要已知一些重叠顺序，最终就能把这些碎片按照正确的顺序拼凑在一起。

五、蛋白质一级结构测定的生物学意义

蛋白质一级结构分析是研究蛋白质结构与功能关系的最基础的工作。在测定了蛋白质和多肽的氨基酸顺序之后，不仅使人工合成有生物活性的蛋白质和多肽成为可能，而且对于揭示一级结构与生物功能间的关系也有着特别重要的意义。人们可以从比较生物化学（Comparative biochemistry）的角度分析比较功能相同、而种属来源不同的蛋白质的一级结构差异，为生物进化提供生物化学依据；也可以分析比较同种蛋白质的个体差异，为遗传病疾的诊治提供可靠根据。下面仅举几例说明一级结构分析的生物学意义。

1. 蛋白质一级结构的种属差异

胰岛素是脊椎动物体内的一种蛋白质激素。不同种属来源的胰岛素都具有相同的生理功能——调节血糖的浓度。功能相同，必然反映出在空间构象上是相同的或相似的。但是，通过分析比较了不同种属来源的胰岛素的一级结构之后，发现它们在氨基酸组成上有较大的差异。在51个氨基酸残基中，只有24个残基是恒定不变的，为不同来源的胰岛素所共有。分析了胰岛素的空结构之后，发现这些不变的氨基酸对于维持胰岛素的空结构是非常重要的。例如，A链和B链中的六个半胱氨酸残基的位置是属于恒定不变的，这就保证了不同来源胰岛素的A、B两条链具有相同的连接方式。我们已经知道，二硫键对于维持蛋白质空结构是很重要的，二硫键的破坏或二硫键连接位置的改变，都会导致蛋白质空结构的破坏或改变。其他不变的氨基酸残基绝大多数属于非极性侧链R基氨基酸，都处于维持胰岛素空结构稳定的重要位置上。由此看来，这24个不变的氨基酸残基起到了使不同来源的

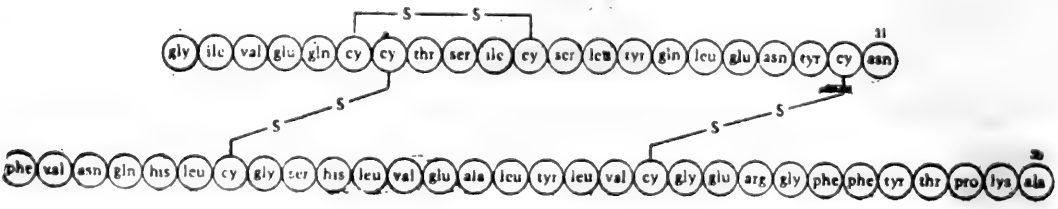


图320 人胰岛素的一级结构

胰岛素具有相同或相似的空间表象的作用。其他可变的残基一般认为处于胰岛素的“活性中心”以外，或对维持“活动中心”不重要，但与免疫性有关。

研究蛋白质一级结构种属差异的另一个有意义的例子是细胞色素 c (Cytochrome c)。细胞色素 c 是存在于需氧生物体内的一种含血红素辅基的蛋白质。不同种属来源的细胞色素 c 都具有相同的生理功能，它是呼吸链的组成成分，在氧化磷酸化过程中起着传递电子的作用。已经测定了50多种生物的细胞色素 c 的一级结构。马心细胞色素 c 的一级结构首先被测

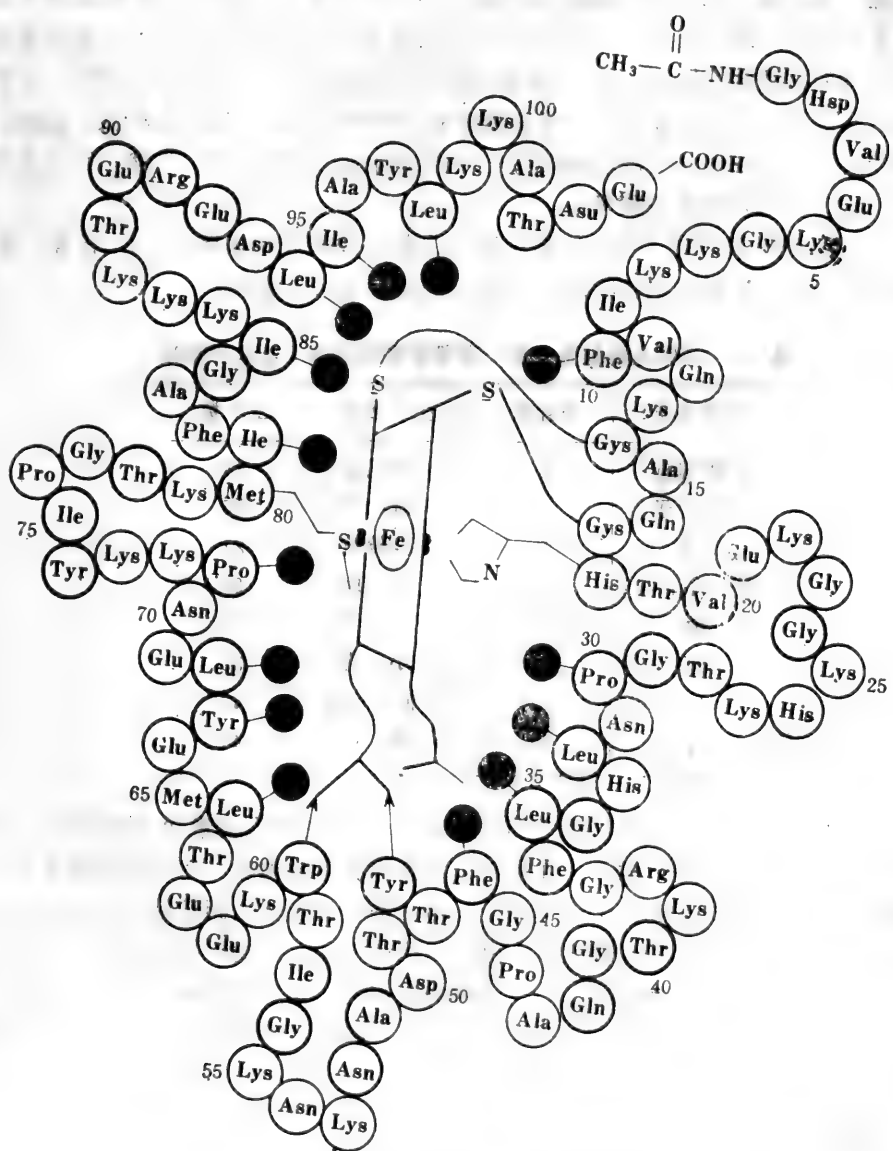


图3-20 马心细胞色素 c 的一级结构

细圆圈表示侧链基团位于外表面的氨基酸，粗圆圈表示侧链基团位于内部的氨基酸，黑色圆点表示对血红素的侧链基团。

定，它是由104个氨基酸残基组成的单链蛋白质。其后被研究过的所有脊椎动物（除金枪鱼外）的细胞色素 c 都是由104个残基组成，其他生物的细胞色素 c 是由104个以上的残基组成，这些多出来的残基都是位于细胞色素 c 的 N-末端。

细胞色素 c 的生物功能与其共价连接的血红素辅基有密切的关系。在分析比较了不同来源的细胞色素 c 的一级结构后发现，只有35个氨基酸残基的位置保持不变，为各种生物的细胞色素 c 所共有。其中14位和17位的两个半胱氨酸、18位的组氨酸、80位的甲硫氨酸以及48位的酪氨酸和59位的色氨酸都是处在不变的位置。这些氨基酸残基对于保证血红素辅基在不同种属的细胞色素 c 中都处于同样的位置起决定性的作用。其他不变的氨基酸残基对于维持不同种属的细胞色素 c 具有相同或相似的构象也是十分必要的。在那些易变的氨基酸中，在很多情况下都是一种氨基酸被另一种性质相似的氨基酸替换，例如，赖氨酸被精氨酸替换；一种疏水侧链氨基酸被另一种疏水侧链氨基酸替换。当然，在有些情况下也被另一种性质完全不同的氨基酸替换。

表 3-4 是在分析了不同生物的细胞色素 c 的氨基酸组成和顺序之后，相互比较得出来的。这个表把人和其他不同生物的细胞色素 c 的差异进行了比较。

表3-4 不同生物细胞色素 c 的氨基酸差异数（以人为基数）

生物名称	差异数	生物名称	差异数
黑猩猩	0	响尾蛇	14
猴 子	1	海 龟	15
兔	9	金枪鱼	21
猪、牛、羊	10	小 蝇	25
狗	11	蛾	31
驴	11	小 麦	35
马	12	粗糙链孢霉	43
鸡	13	酵 母	44

从这个表我们可以看出各种生物的细胞色素 c 与人的细胞色素 c 结构差异，凡是与人的亲缘关系愈近者，结构差异愈小；凡是与人的亲缘关系愈远者，结构差异就愈大。例如人和黑猩猩及猴子都属于灵长类，亲缘关系近，即在进化位置上相距较近，它们在结构上的差异就很小。但人与其他种类的生物比较，由于亲缘关系远，结构差异就大。除灵长类外的哺乳动物，结构差异也不大，这说明它们的亲缘关系较近，在进化位置上相距也不远，但是与人相比则有较大的差异。从这样的分析比较中可以看出彼此的亲缘关系，为生物进化提供有价值的根据。

2. 蛋白质一级结构的个体差异

镰刀形红细胞贫血病在非洲人中比较常见，患者的红细胞合成了一种不正常的血红蛋白（HbS）。这种不正常的血红蛋白和正常的血红蛋白（HbA）的差别在什么地方呢？为了揭示 HbS 和 HbA 在功能上的差别，有人将两者进行了比较研究。发现可用电泳的方法将两种蛋白质分开。这表明它们在电荷数量上有差别，而且这种差别一定是由于氨基酸残基的改

变所造成的。于是对二者进行了一级结构的分析。将这两种蛋白质在同样的条件下用胰蛋白酶进行降解，采用电泳-层析的方法分离所产生的片段。分析比较产生的片段，发现仅有一个肽碎片的电泳行为与正常者不同（图3-22）。进一步分析了两者的氨基酸顺序，确定它们的差别是在 β -链 N-端的第六位氨基酸残基上。正常人的 HbA β -链 N-端第六位是谷氨酸，而患者的 HbS β -链 N-端第六位是缬氨酸：

(HbA) : H_2N -Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Lys..... COO^-

(HbS) : H_2N -Val-His-Leu-Thr-Pro-Val-Glu-Lys..... COO^-

由于这两个氨基酸性质上的差别（谷氨酸在生理 pH 下为带负电荷的极性 R 基氨基酸，而缬氨酸却是一种非极性侧链 R 基氨基酸），就使得 HbS 分子表面的负电荷数减少，影响分子的正常聚集，致使体积下降，溶解度降低，血球随之收缩成镰刀形，以致输氧功能下降，细胞变得脆弱发生溶血。血红蛋白是由两条 α -链和两条 β -链构成的蛋白质，仅仅只有两条 β -链的两个氨基酸残基发生改变，竟导致功能上如此重大变化而使人患此重病，足见结构与功能关系的高度统一。

血红蛋白在结构上氨基酸残基的改变是由于编码它的基因发生了点突变的结果，编码谷

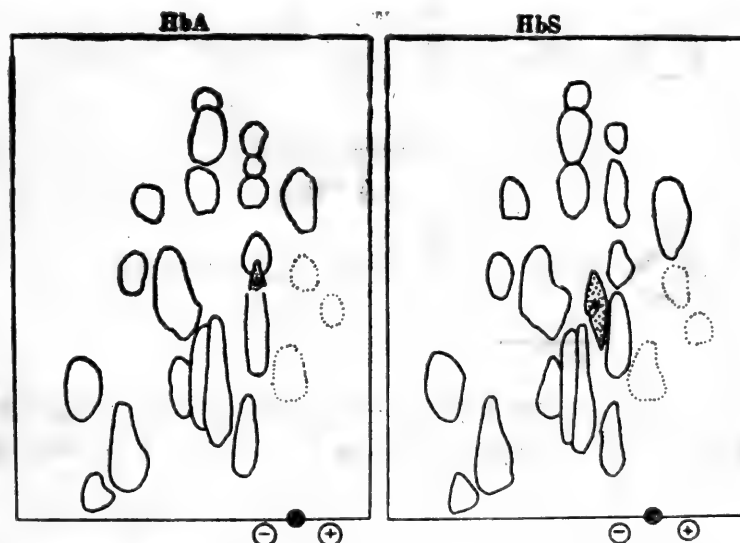


图3-22 HbA 和 HbS 的酶解图谱（中间有点者表示有差异的碎片）

氨酸的遗传密码子突变为编码缬氨酸的遗传密码子。这种因基因突变产生异常蛋白，从而导致的先天性疾病，就叫做分子病或遗传病。血红蛋白一级结构发生改变而导致的血红蛋白分子病的类型很多，镰刀形红细胞贫血病只是其中的一种。了解到分子病发生的原因后，可以设计出一些新药给予治疗。例如，异氰酸盐 ($H-N=C=O$) 可以与 HbS N-末端缬氨酸残基上的游离氨基结合，使其氨甲酰化，可以恢复其分子表面的电荷数，从而改善病情。

六、多肽和蛋白质的化学合成

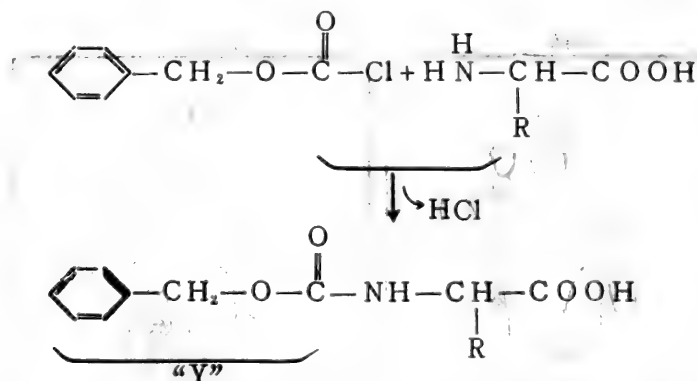
多肽和蛋白质氨基酸顺序的测定为化学合成具有生物活性的肽和蛋白质提供了可靠的信

息。某些已知氨基酸顺序的多肽和蛋白质在医疗上有重要的价值，而从动物脏器中把它们分离纯化出来往往要花费艰巨的劳动，而且价格昂贵。若能化学合成这样的药物，其意义是显而易见的。化学合成具有生物活性的蛋白质或多肽对于阐明蛋白质的结构与功能的关系也是非常重要的。在这方面，我国科学家做了开创性的工作，1965年在世界上首次人工合成了具有生物活性的蛋白质——结晶牛胰岛素。

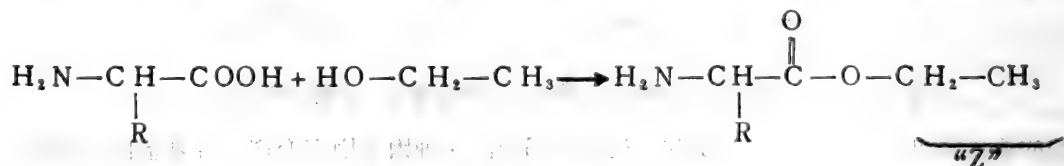
1. 肽化学合成的一般原则

(1) α -氨基和 α -羧基的保护与活化

每种氨基酸的 α -氨基或羧基都能同另一种氨基酸的 α -羧基或氨基结合成肽键。要使甲种氨基酸的 α -羧基同乙种氨基酸的 α -氨基起反应，又不致使甲种氨基酸的 α -氨基同乙种氨基酸的 α -羧基起反应，就需要把甲种氨基酸的 α -氨基和乙种氨基酸的 α -羧基分别保护起来。氨基和保护是建立在它们特有的化学反应基础上的。目前，氨基的保护应用最多的是苄氧甲酰氯。苄氧甲酰氯与氨基酸或肽上的游离的 α -氨基起反应时，整个氨基酸或肽可以看作是亲核试剂向羰基进攻。此外，对甲基苯磺酰氯和叔丁氧甲酰氯对氨基也有保护作用。氨基的保护基(剂)用 Y 表示。



羧基的保护一般是用无水乙醇或甲醇在干燥氯化氢气体的存在下进行酯化即可达到目的。这是利用氨基酸 α -羧基的成酯反应性质。羧基的保护基(剂)用 “Z” 表示。

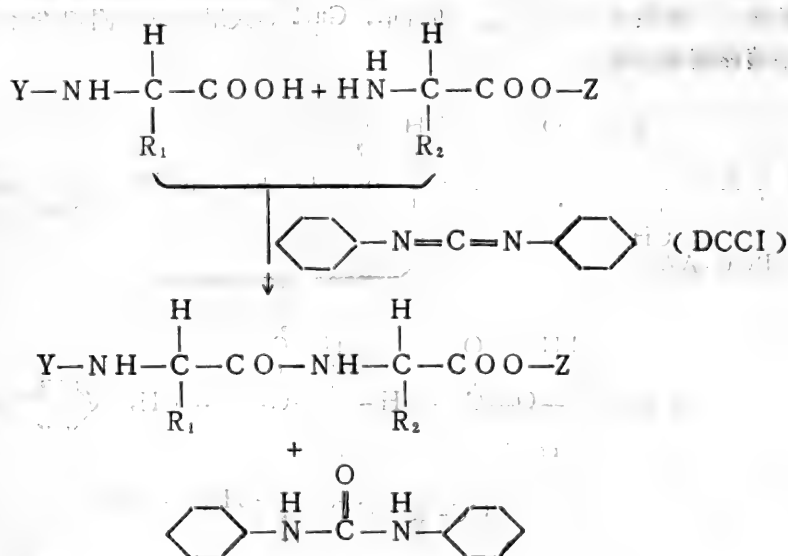


氨基酸的羧基变成乙酯或甲酯后，其化学性质被掩盖了(或者说羧基被保护了)，而氨基的化学性质就突出地显示出来了(或者说它被活化了)。

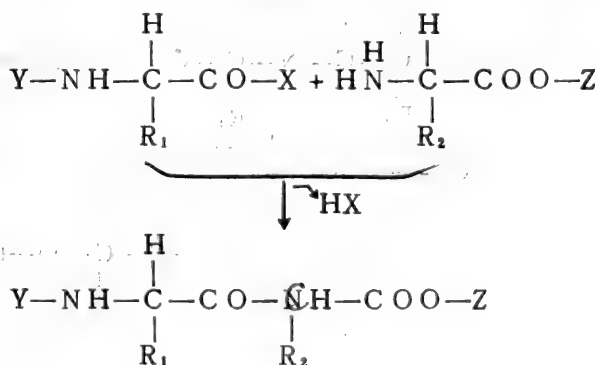
某些氨基酸的侧链基团，如-SH、-NH₂、-COOH 以及胍基等等，也需要用适当的保护基(剂)加以保护，以避免接肽时与接肽剂发生反应，生成不必要的肽键或其他键，使产物复杂化。

(2) 接肽反应

将 α -氨基被保护的甲种氨基酸同 α -羧基被保护的乙种氨基酸在有缩合剂存在的情况下进行接肽反应。常用的缩合剂（即接肽剂）是 N,N-二环己基碳酸酐二亚胺（简称 DCCI）。在接肽反应中，它能从两个氨基酸分子中夺取一个水分子，本身转变成不溶于水的 N,N-二环己脲（DCU），使合成的肽很容易分离。



若使氨基被保护后的甲种氨基酸的羧基活化，可不必再加缩合剂。目前多使用叠氮化合物法或活化酯法作为活化羧基的手段。活化剂（基）用“X”表示。氨基的活化不需要特殊的手段，一般只是在接肽反应时加入有机碱如三乙胺以保证氨基的自由状态即可。



（3）脱去保护基

氨基的保护基 Y 若是苄氧甲酰基则可用催化加氢法或用金属钠在液氨中处理除去。若 Y 是叔丁氧甲酰基，可用稀盐酸或乙酸在室温下除去。

羧基的保护基 Z 是 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 或 $-\text{CH}_3$ 时，可以在常温下用 NaOH 皂化除去。

侧链基团的保护基的除去因情况而异，均有相应的方法除去。

如果要使肽链继续延长，可将保护基 Y 或 Z 除去其中一个，然后再接上其他带有保护基的氨基酸。如此重复下去，即可合成多肽。

上述合成肽的方法是在溶液中进行的，故称为液相合成法，我国合成的牛胰岛素即采用此种方法。

2. 固相法合成多肽

固相法合成多肽的方法是于60年代初期建立的。这个方法简便、快速，又便于自动化，是合成多肽的一种很有用的方法。1961年，Gutt 等人用自动化固相法合成了第一个人工的酶——牛胰核糖核酸酶，

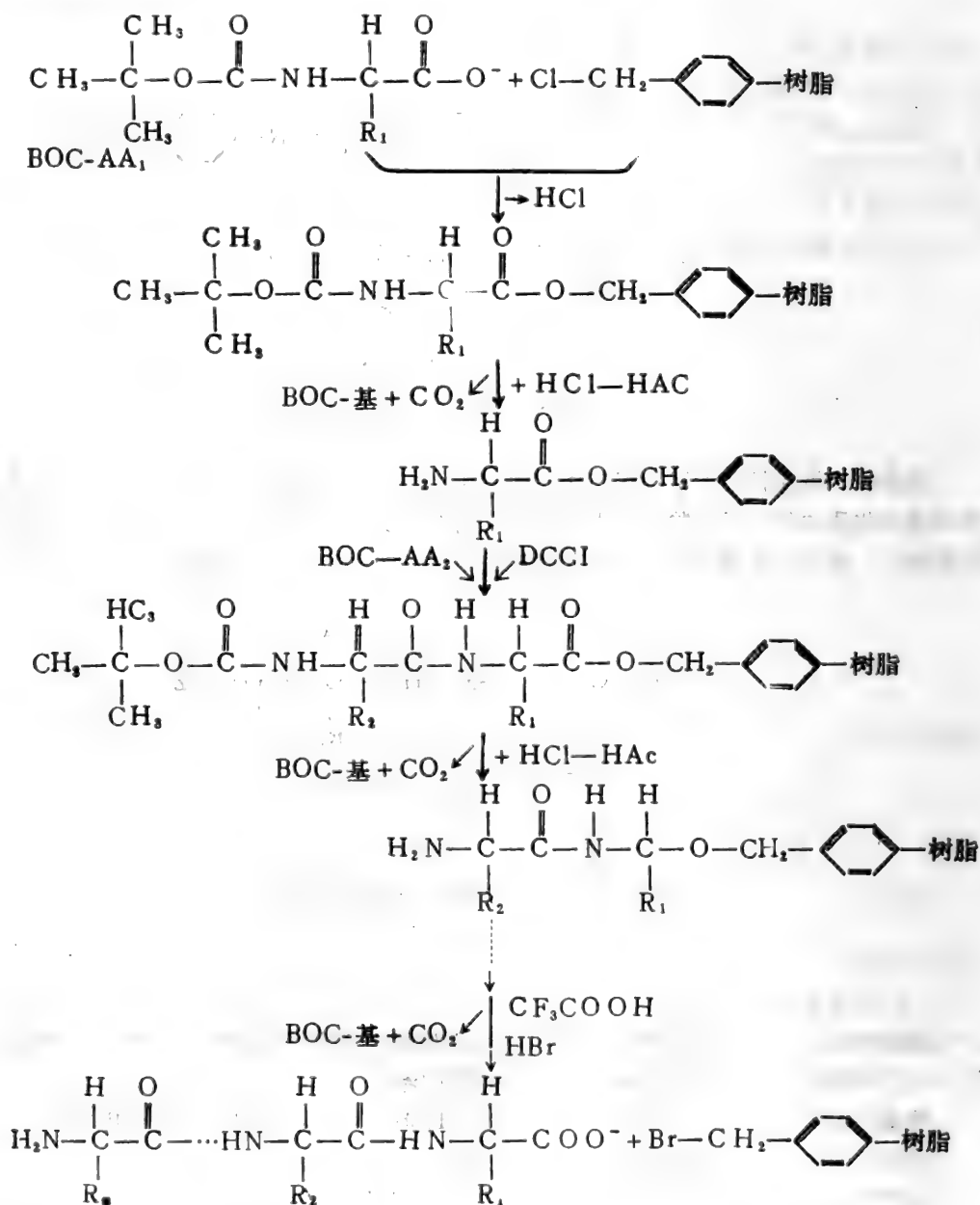


图3-23 固相法合成多肽

固相法合成多肽的原理与液相法的原理基本上相同，只不过前者是在固体支持物上进行的。常用支持物是氯甲基聚苯乙烯与二乙烯所合成的树脂。

合成多肽时，首先将氨基被保护的氨基酸(如叔丁氧甲酰基氨基酸，简称 BOC-氨基酸)同树脂的氯甲基起反应生成 BOC-氨酰基树脂，随即脱去保护基。于是就得到了含自由氨基的氨酰基树脂。

在有缩合剂 N,N-二环己基羰二亚胺的存在下，加入第二种 BOC-氨基酸，即可得到 BOC-二肽树脂。然后又除去保护基 BOC-。如此重复下去，即可按照特定的顺序使肽链延长。

接肽完成之后，可把多肽-树脂悬浮于无水三氟醋酸中，通入干燥的 HBr，使多肽与树脂分开，亦可把其他一些保护基除去。

在固相法合成多肽的基础上，已经设计制造了自动化固相多肽合成仪。这为蛋白质和多肽的化学合成提供了方便。许多在医疗上有用的多肽激素，如催产素、加压素等多种多肽激素已采用人工合成的方法进行生产。

第四节 蛋白质的空间构象

通过对蛋白质多肽链的氨基酸顺序的测定，我们已经认识到不同的蛋白质有不同的氨基酸组成和不同的氨基酸排列顺序。但是，这不是蛋白质之间区别的全部。事实上，通过对蛋白质结构的研究，发现每种蛋白质都能在它特定的一级结构基础上选择它特定的空间构象去完成它特定的生物功能。为了运送氧，血红蛋白的肽链必须按照它所选择的方式折叠；核糖核酸酶必须达到它一定的构象才能同核糖核酸结合并降解它。这说明蛋白质一定的空间构象是完成其功能所必须的。

那么，什么是蛋白质的空间构象呢？蛋白质分子具有一条或多条肽链，肽链既不是直线的，也不是随机的线团，而是在空间上有特定的走向与排列。简单地讲，蛋白质的空间构象就是指蛋白质分子中的原子或基团在三维空间上的排列、分布及肽链的走向。

构象的概念和构型的概念是不相同的。一个分子内的原子间的关系在化学家的手中表达成平面式，例如某种氨基酸，我们通常写成平面结构式：
$$\text{R}-\text{CH}-\text{COO}^-$$



表达和交流的方便。分子内原子间的关系是立体的。构象和构型就是从不同的角度来表述这种立体的关系。构型(configuration)是指不对称碳原子所连接的四个不同的原子或基团在空间中的两种不同的排列(例如氨基酸的 D 型和 L 型)。而构象(conformation)指的是，一个由几个碳原子组成的分子，因一些单键的旋转而形成的不同碳原子上各取代基团或原子的空间排列。构型的改变必然会引起共价键的破坏，并形成一些新键(如氨基酸由 D-型变成 L-型)。构象的改变并不需要共价键的断裂，只需要单键的旋转就可造成新的构象的产生。

一、研究构象的方法

在本世纪30年代末，L. Pauling 和 R. Corey 开始了氨基酸和肽的精细结构的 X-射线

晶体衍射的研究。当时，他们的主要目的是为了获得这些构件单元的标准键距和键角，然后用这些资料去预测蛋白质的构象。从那时起来，X-射线晶体衍射法一直是测定蛋白质晶体结构的极其重要的方法。

蛋白质分子中的单个原子间的距离是很小的，不能用光学显微镜去观察蛋白质分子内部的细微结构。可见光的波长太长，不能用来放大蛋白质分子，必须用波长很短的放射线来进行放大。X-射线放大蛋白质的第一步同光学显微镜的第一步相类似（当可见光照射到物质上时，光波衍射）：用一束X-射线照射蛋白质晶体时，X-射线是通过围绕不同原子中心聚集的电子进行衍射的。进行X-射线衍射时，由于没有收集和重新结合衍射的X-射线的反射镜和透镜系统，因而不能产生有意义的图象。但是，却允许衍射的X-射线打在能感光的胶片上，在胶片上产生一系列的斑点。这些斑点的强度是由蛋白质分子中的原子的排列决定的。通过X-射线从不同角度穿透蛋白质晶体产生大量不同的斑点图案。最后，通过复杂的计算，分析并综合从斑点图案中得到的数据，从而得到蛋白质分子的三维图象。

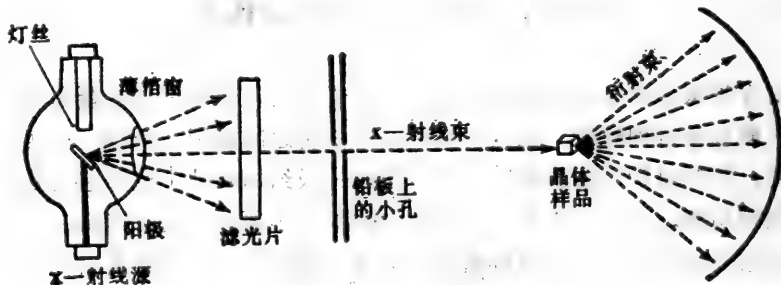
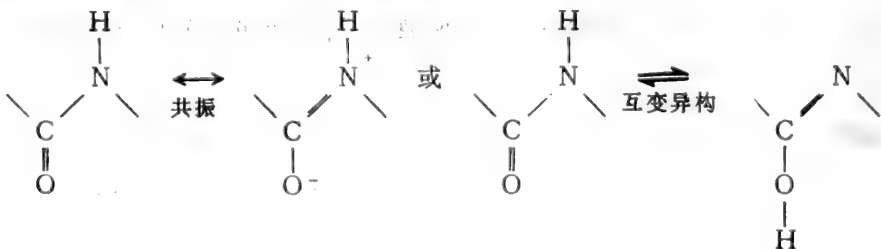


图3-24 晶体样品 X-射线衍射示意

二、蛋白质的二级结构 (Secondary structure)

1. 肽单元 (peptide unit)

Pauling 等人根据对氨基酸和一些小肽的 X-射线晶体结构分析，发现：① 肽键 ($-\text{CO}-\text{NH}-$) 中的四个原子和与它相邻的两个 α -碳原子 (C_α) 都位于同一刚性平面 (Rigid plane)，构成一个肽单元 (图 30-25(a))，② 肽键上的 $-\text{NH}-$ 的 H 与 $>\text{C}=\text{O}$ 上的 O 几乎总是处在相反的部位，③ 肽键上的 $\text{C}-\text{N}$ 键具有部分双键的性质，不能自由旋转。肽键上的 $\text{C}-\text{N}$ 键的长度为 1.32 \AA ，而其他的 $\text{C}-\text{N}$ 键的长度是 1.49 \AA ， $\text{C}=\text{N}$ 双键的长度是 1.27 \AA 。肽键上的 $\text{C}-\text{N}$ 键的长度介于其他 $\text{C}-\text{N}$ 键和 $\text{C}=\text{N}$ 双键长度之间。产生这种现象的原因是肽键 ($-\text{CO}-\text{NH}-$) 存在这样一种平衡关系：



这样就使肽键上的 C—N 键具有了部分双键的性质。由于这一特性使得一条多肽链的构象数目受到了很大的限制。

与上述情况相反， $C\alpha$ 与羰基碳原子之间的连接键是纯粹的单键， $C\alpha$ 与氮原子之间的连接键也是纯粹的单键。这两个键在刚性平面的任何一侧都有较大的旋转程度。 $C\alpha$ —N 单键旋转的角度用 ϕ 表示， $C\alpha$ —C 单键旋转的角度用 ψ 表示（图3-25(b)）。由于 α -碳原子实际上处在两个刚性平面的交线上，所以 α -碳原子上的这两个旋转角度（ ϕ 、 ψ ）就决定了相邻两个肽平面的相对位置。

实验表明，多肽链中所有肽单元基本上都具有相同的键距和键角；每一个 α -碳原子都是正四面体构型。因此，多肽链的构象是由每个 α -碳原子的一对 ϕ 和 ψ 角所决定的。在多肽链中，任何 α -碳原子的 ϕ 角或 ψ 角如果发生变化，则多肽链主链的构象必然发生相应的变化。如果所有的 α -碳原子的这一对角都分别相等，则多肽链主链呈现有规律的构象。如果多肽链完全伸展，则 ϕ 角和 ψ 角的值均当作零。从 N-末端看去，以顺时针向 180° 的方向旋转的角度用 “+” 号表示，以逆时针向 180° 方向旋转的角度用 “-” 号表示（图6-25(c)）。

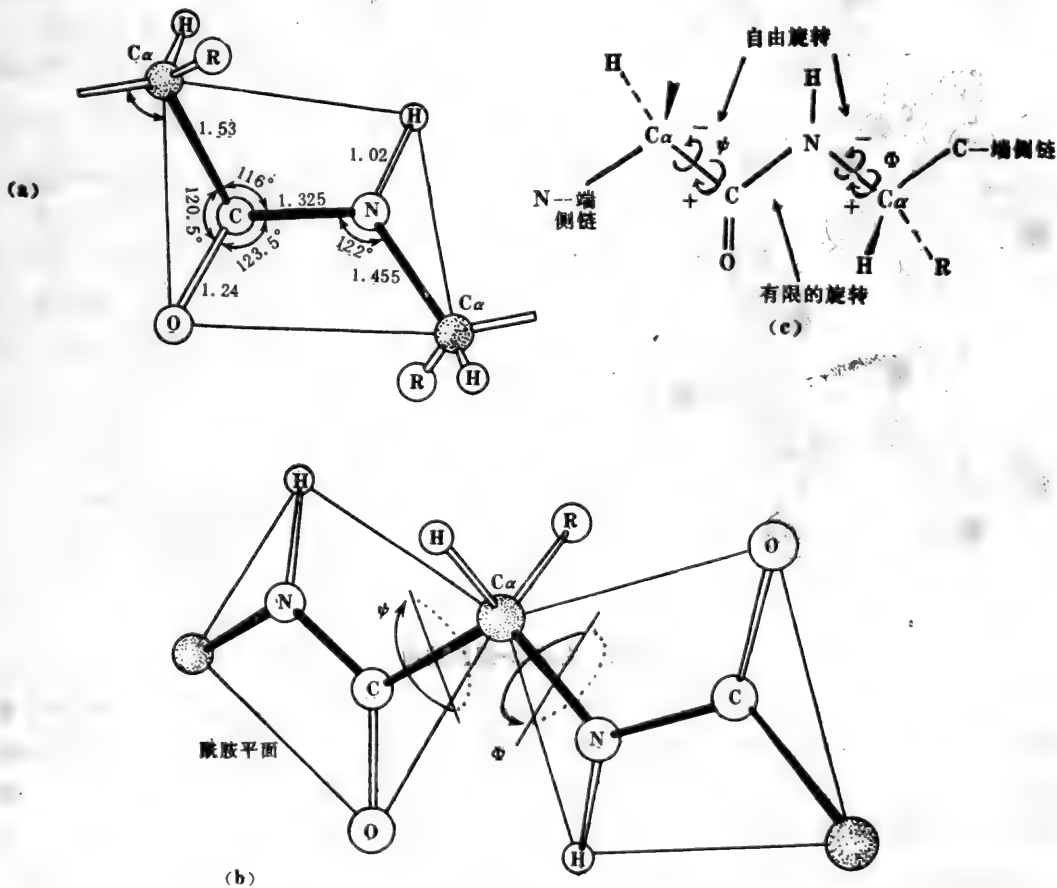


图3-25 肽平面(a)以及相邻两个肽平面交线上的 $C\alpha$ 的旋转角(b)和 ϕ 角、 ψ 角正负值的规定(c)

多肽链主链上的 $\text{Ca}-\text{N}$ 和 $\text{Ca}-\text{C}$ 键虽然能自由旋转，但不是完全不受限制的。主链构象的不同，侧链 R 基就会出现不同的空间位置上。侧链 R 基有大有小，相互之间的作用有所不同，或是彼此吸引，或是相互排斥。侧链基团的这种作用也会影响到主链上单键的旋转。于是使得蛋白质构象的数目又受到很大的限制。由于主链和侧链的相互影响，就会使蛋白质分子达到一种最稳定的构象。

2. α -螺旋结构 (α -helical structure)

Pauling 等人估计了各种可能的多肽构象后，于1951年提出了一种周期性的肽结构—— α -螺旋结构 (图3-26)。

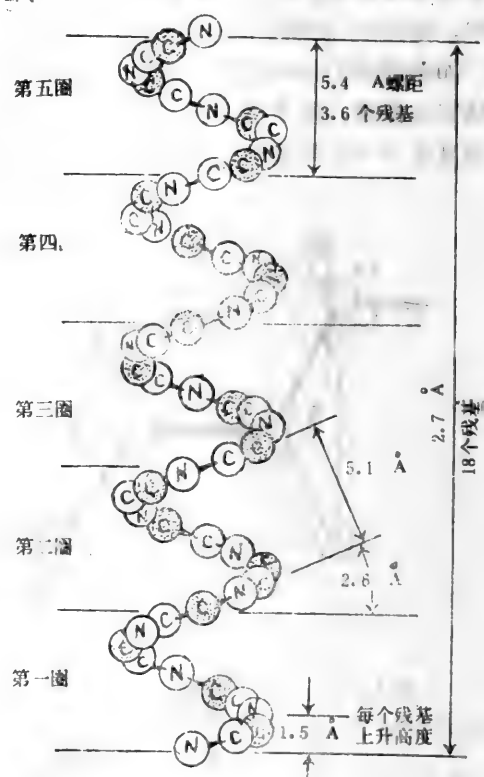
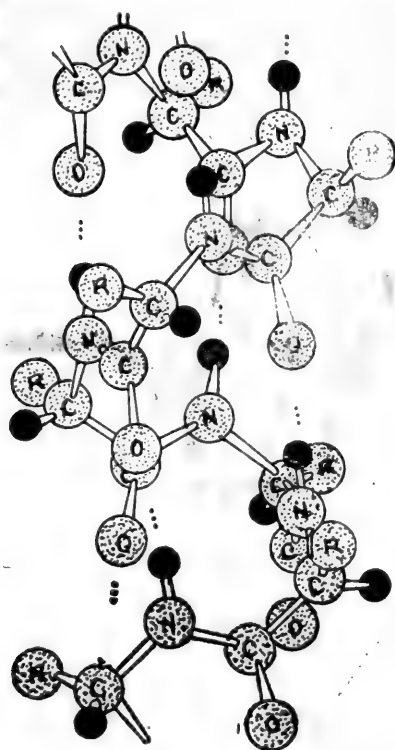
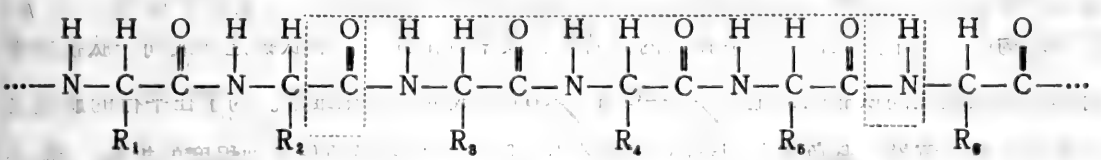
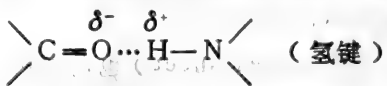


图3-26 右手 α -螺旋结构

所谓螺旋结构就是指多肽链主链环绕螺旋中心轴一圈一圈地上升，从而形成螺旋式（象弹簧样）的结构。 α -螺旋结构是最稳定的螺旋结构。它具有如下的特征：①多肽链主链环绕螺旋中心轴螺旋式地上升，每隔 3.6 个氨基酸残基螺旋上升一圈。螺旋沿中心轴每上升一圈相当于向上平移 5.4 \AA 。②螺旋上升时，每个氨基酸残基沿轴旋转 100° ，向上平移 1.5 \AA 。③每一个 ϕ 角等于 -57° ，每一个 ψ 角为 -47° 。④每个氨基酸残基上的亚氨基 ($>\text{NH}$) 和位于它前面的第四个氨基酸残基上的羰基 ($>\text{C}=\text{O}$) 形成氢键。肽键上的 $>\text{C}=\text{O}$ 上氧的电负

性较大，含有独对电子，具有吸引质子的能力；而 $>NH$ 基上氮的电负性也较大，能吸引氢原子核周围的电子，使得氢原子核外层电子密度减少而带上微弱的正电荷。于是在 $>C=O$ 和 $>NH$ 之间就有了相互吸引力。这种吸引力就叫做氢键。虽然氢键是一种很弱的次级键，



但是由于主链上所有的 $>NH$ 和 $>C=O$ 都参与了氢键的形成，所以 α -螺旋结构是很稳定的。氢键几乎同 α -螺旋的长轴平行。⑤氨基酸残基的 R 基团从 α -螺旋伸出，不会出现在螺旋圈内。

根据多肽链主链旋转方向的不同， α -螺旋有右手螺旋和左手螺旋之分。这两种 α -螺旋的区别在于：在左手 α -螺旋中，侧链 R 基团上的第一个碳原子 (C_β) 过分接近主链的 $>C=O$ 上的氧原子，以致构象不适，能量较高。右手 α -螺旋没有这种缺点。因此，右手 α -螺旋最易形成也最稳定。在蛋白质分子中， α -螺旋都是右手螺旋。

上述右手 α -螺旋是最典型的螺旋，称为 3.6_{13} 螺旋。这种螺旋在蛋白质结构中广泛存在。此外，在蛋白质的结构研究中也发现其他一些不典型的螺旋，如 3_{10} 螺旋、 4.4_{11} 螺旋等。各种螺旋结构常用 S_N 来表示。S 是螺旋每上升一圈的氨基酸残基数，N 表示氢键封闭的环本身的原子数。图3-27为三种螺旋的模式。

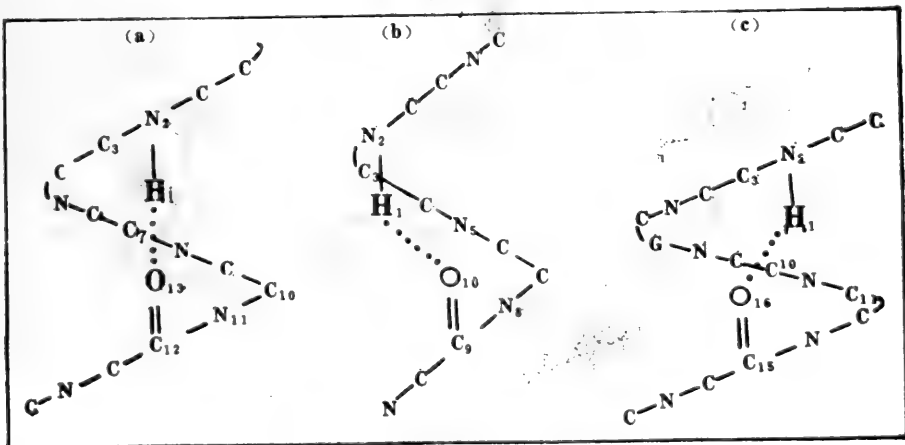


图3-27 螺旋结构的三种类型
 (a) α -螺旋 (3.6_{13} 螺旋)；(b) 3_{10} 螺旋；(c) π -螺旋 (4.4_{11} 螺旋)。
 但 3_{10} 螺旋和 4.4_{11} 螺旋只是有时在 α -螺旋片段的末端发现。

α -螺旋结构提出后就首先较好地解释了各种毛、发等 α -角蛋白的 X-射线晶体衍射图案。后来在球状蛋白的 X-射线晶体衍射图案中广泛发现此种结构。由于 α -螺旋结构只涉及蛋白质多肽链主链在空间上的走向, 不涉及侧链 R 基团在空间中的排列, 所以 α -螺旋结构是蛋白质多肽链主链的一种典型的构象。人们把这种主链构象称之为二级结构。

3. β -折叠结构 (β -pleated structure)

β -折叠结构 (或 β -折叠片, β -pleated sheet) 也是 Pauling 于 1951 年提出的一种多肽链主链构象, 是一种周期性的肽结构。 β -折叠结构与 α -螺旋结构有着显著的区别。在 β -折叠结构中, 若干条肽链或一条肽链内的若干肽段平行排列。相邻肽链之间或同一肽链内平行排列的肽段之间依靠肽键上的 $>C=O$ 和 $>NH$ 形成的氢键来维系。为了在平行的肽链之间形成最多的氢键, 避免相邻侧链 R 基团的空间障碍, 肽链必须作某种程度的折叠, 两个残基两端的 $C\alpha$ 间的距离缩小, 形成一种折叠的片层结构。与 $C\alpha$ 相连的侧链 R 基团交替地位于片层的上方和下方, 并与片层相垂直。由于 β -折叠结构的上述特点, 所以它是折叠

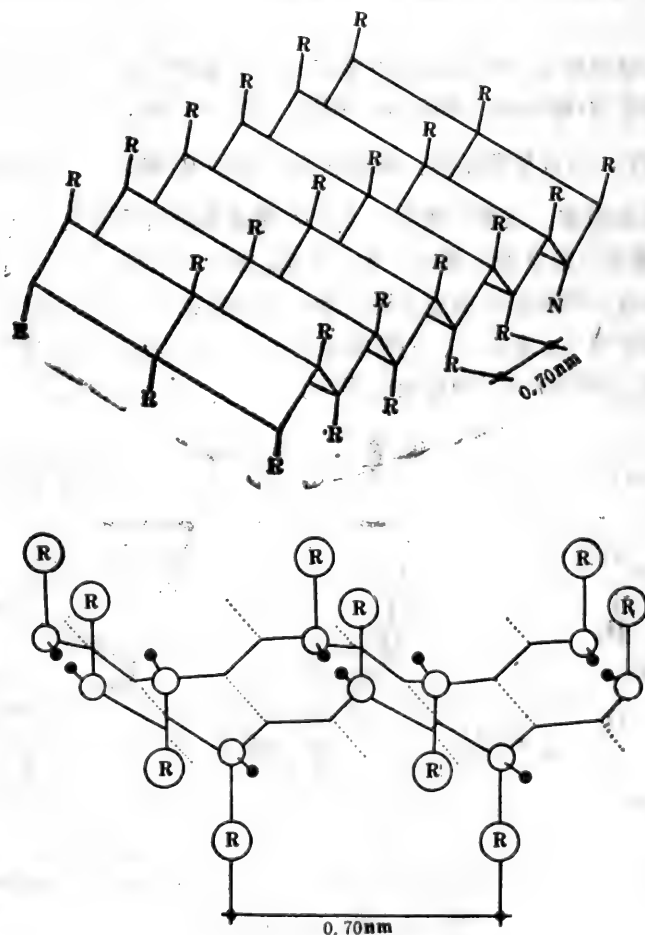


图3-28 β -折叠结构

片状的(呈锯齿状)而不是卷曲状的。 β -折叠状的多肽链几乎完全伸展。

β -折叠结构有两种类型,一种是平行式(Parallel),即所有肽链的N-末端都在同一侧,另一种是反平行式(Antiparallel),即肽链的N-末端一顺一反地排着(见图3-29)。

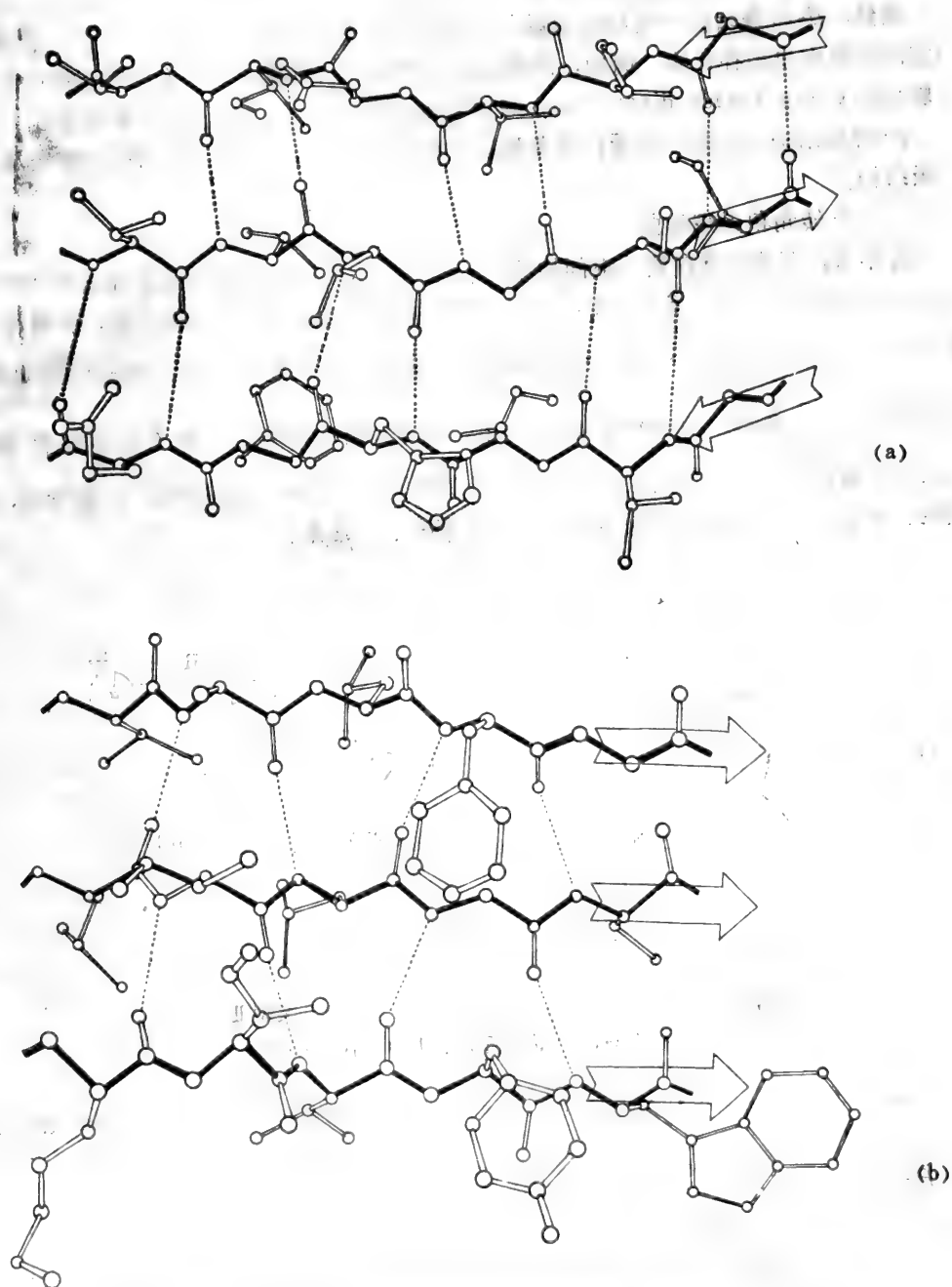


图3-29 (a)反平行式 β -折叠(来自超氧化物歧化酶的 β -折叠片);
(b)平行式 β -折叠(来自黄素氧还蛋白的 β -折叠片)

β -折叠结构之所以是一种周期性的肽主链结构，是因为在它的纤维轴方向上具有重复距离，在反平行式结构中此距离7 Å。而在平行式结构中为6.5 Å。此外，在反平行式结构中， ϕ 角和 ψ 角分别为 -140° 和 $+135^\circ$ ，在平行式结构中， ϕ 角和 ψ 角分别为 -119° 和 $+113^\circ$ 。 α -角蛋白变性伸展后呈现为平行式 β -折叠。

虽然， β -折叠结构一般与结构蛋白的空间构象有关（见后述）但是，在一些球状蛋白的空间构象中也是存在的，例如，溶菌酶、羧肽酶、黄素氧还蛋白（flavodoxin）和超氧化物歧化酶（Superoxide dismutase）等球状蛋白质中都存在这种 β -折叠构象。

β -折叠结构也只是涉及蛋白质多肽链主链在空间上的走向，因此 β -折叠结构也是一种二级结构。

4. β -转角和无规卷曲

近年来，在球状蛋白质的空间构象的研究中，还经常观察到肽链主链出现 180° 的回折，这种回折称为 β -转角（ β -Bend）。它也是蛋白质多肽链主链的一种构象。有两种类型的 β -转角，它们都是由四个连续的氨基酸残基组成，第一个残基上的 $>C=O$ 与第四个残基上的 $>NH$ 形成氢键。两种类型的 β -转角的主要区别是连接 Ca_2 和 Ca_3 的肽键的方向，以及形成氢键的原子的方向（见图3-30）。许多氨基酸都有可能出现在 β -转角中，但尤以甘氨酸、脯氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺以及色氨酸最为常见。

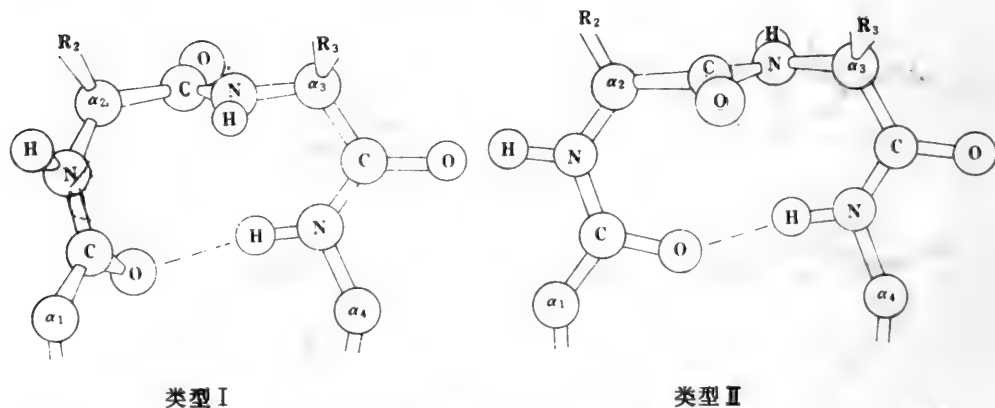


图3-30 蛋白质分子中的两种 β -转角

无规卷曲（random coil）是指没有规律性的那部分肽链的构象，是一种任意的肽链构象。

β -转角和无规卷曲是球状蛋白质形成近似球形的空间构象所必需的主链构象，与球状蛋白质的生物功能有着密切的关系。

综上所述，我们可以看出，蛋白质的二级结构通常是指蛋白质多肽链主链在空间中的走向，一般形成有规律的构象，并以氢键来维持主链构象的稳定。这级水平的构象不涉及氨基酸残基的侧链基团在空间中的排列和各种主链构象之间的关系。

三、蛋白质的三级结构(Tertiary structure)

蛋白质的三级结构比二级结构复杂得多。它是指一条多肽链在二级结构的基础上进一步在三维空间上沿多个方向盘绕、折叠成很不规则的具有特定构象的球形结构(图3—31所示)。蛋白质多肽链经受的这些盘绕、折叠,是由其分子中各氨基酸残基的侧链基团的特殊倾向和顺序规定的。换句话说,多肽链中氨基酸残基的侧链基团相互作用所形成的各种特殊的构象决定了多肽链主链在三维空间上的走向。极性的侧链基团,由于它们的亲水性,绝大多数分布在球状分子的表面,形成亲水区;而非极性的侧链基团,由于它们的憎水性,具有避开水

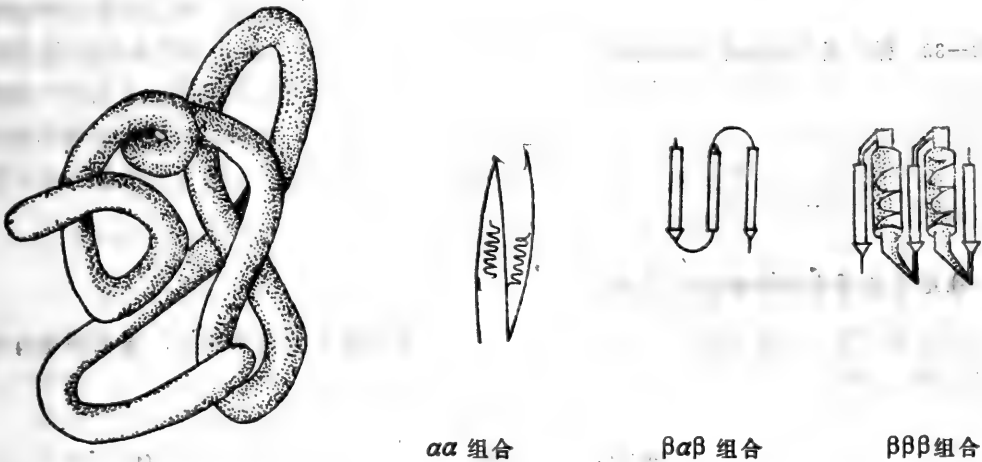


图 8—31 蛋白质的三级结构

图 3—32 蛋白质的超二级结构

水的倾向,使得它们在分子内部彼此接近而形成疏水区或疏水核。三级结构代表了分子内各种作用力的总结果

三级结构只涉及侧链基团的构象和各种主链构象之间的相互关系,不涉及亚基或分子之间的空间排列关系。对于单链蛋白质来说,三级结构就是它的空间结构;对于多链蛋白质来说,三级结构是指各组成链,主链和侧链各自的空间构象。

随着蛋白质空间结构研究的深入,在二级结构和三级结构之间还可以进一步细分为超二级结构和域结构(domain)。超二级结构是指顺序上相互邻近的二级结构常常在空间折叠中靠近,彼此相互作用,形成规则的二级结构聚合物。已发现的超二级结构有三种基本形式,即 α -螺旋的组合($\alpha\alpha$), β -折叠组合($\beta\beta\beta$), α -螺旋和 β -折叠的组合($\beta\alpha\beta$)。其中以 $\beta\alpha\beta$ 这种组合方式最为常见。超二级结构以特定的组合方式连接,在一个较大的蛋白质分子中形成两个或多个在空间上可以明显区分的折叠实体,这种实体称为域结构。域结构与分子整体以共价键相连,一般难以分离,这是它与蛋白质的亚基结构的根本区别。不同的域结构往往承担着不同的功能,免疫球蛋白就是一个典型的例子。现已认识到域结构是蛋白质三级结构的基本组件单位。

四、蛋白质的四级结构(Quaternary structure)

事实上,许多生物活性蛋白质是由两条或多条肽链构成,肽链与肽链之间并不是通过共价

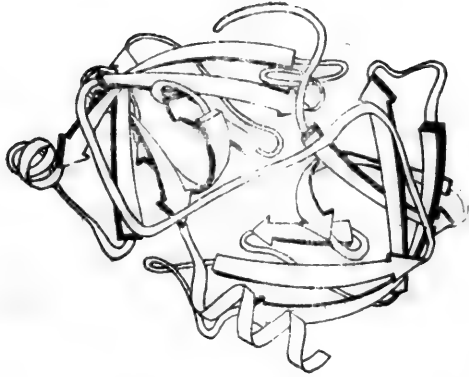


图3—33 弹性蛋白酶的两个域结构

成的巨大蛋白质；亮氨酸氨肽酶是由六个相同的亚基构成。由相同亚基构成的蛋白质的四级结构称为均一的四级结构。有些蛋白质是由几种不同的亚基构成，这类蛋白质的四级结构即称为不均一的四级结构。例如乳酸脱氢酶、天冬氨酸转氨甲酰基酶、血红蛋白等都是由不同的亚基组成的，具有不均一的四级结构。

五、稳定蛋白质空间构象的作用力

蛋白质特定的空间构象是靠什么力量来维系呢？根据对蛋白质结构研究，蛋白质空间构象的稳定主要是靠图3—34所示的各种键或作用力维持。

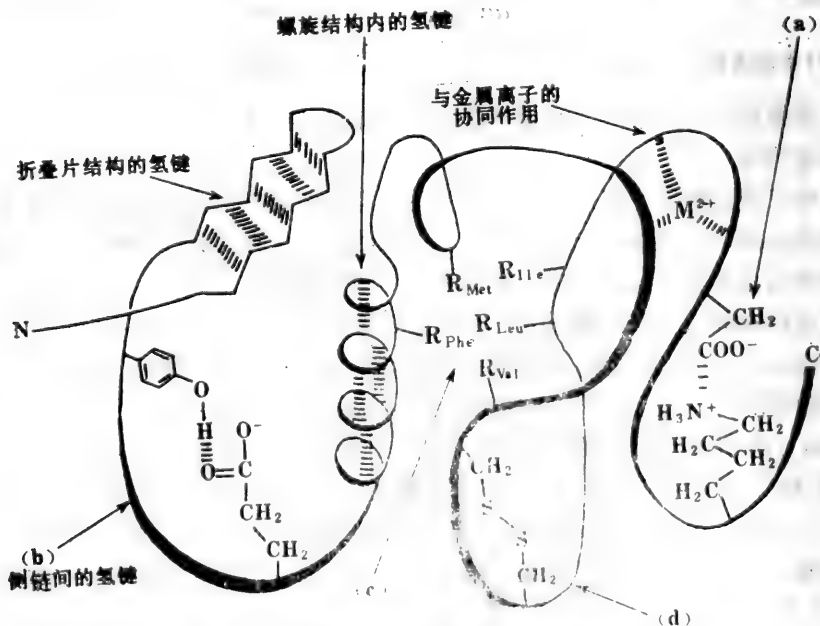


图3—34 维持蛋白质构象的各种作用力

(a) 离子键(盐键)；(b) 氢键；(c) 非极性侧链基团的相互作用；(d) 二硫键。

1. 氢键

在蛋白质分子中形成的氢键有两种情况。一种是肽主链上的 $>C=O$ 和 $>NH$ 之间形成的氢键，蛋白质二级结构的稳定主要是依靠这样的氢键。另一种是侧链之间或侧链与主链之间形成的氢键。例如丝氨酸、酪氨酸和苏氨酸侧链上的 $-OH$ 可以与谷氨酸、天冬氨酸的侧链羧基形成氢键。这一类型的氢键对于蛋白质三级结构的稳定起着一定的作用。

2. 带电的侧链基团之间的相互作用力

同种电荷相斥，异种电荷相吸，这是我们所熟知的。由于蛋白质多肽链中的某些氨基酸的侧链基团在生理 pH 下能解离而带电荷，所以，电荷的相互作用在蛋白质的三维构象稳定方面是一种重要的因素。带负电荷的侧链基团 $-COO^-$ 吸引带正电荷的侧链基团 $-NH_3^+$ 。这种吸引作用叫做离子键或盐键。它可以连接蛋白质的不同部分。另一方面，带同种电荷的侧链相互排斥，使蛋白质多肽链的不同部分保持正常距离。上述两方面的作用的结果，必然在某种程度上使蛋白质多肽链折叠、盘绕。

3—35 异种电荷的相互吸引作用

3. 疏水作用和亲水作用

这里所指的疏水作用和亲水作用是指不同氨基酸的侧链 R 基团和水之间的相互关系。极性的侧链 R 基团是亲水的，被水所包围；非极性的侧链 R 基团是憎水的，具有避开水的倾向。

极性的或非极性的 R 基团与水的相互作用怎样影响蛋白质三维构象呢？在细胞液态环境下，从多肽链主链伸出的这些侧链 R 基团依据它们对水的亲和与不亲和来排布它们自己在空间上的位置。由于极性 R 基的亲水性，它们就必然努力伸向蛋白质分子的外表面，形成亲水区。非极性的 R 基团由于它们的憎水性而产生避开水的倾向，则使它们在分子内部彼此接近，紧密地聚集在一起，形成特有的非水环境，即所谓疏水区或疏水核。正是由于极性和非极性的侧链 R 基同水的这些相互作用使肽链的某些部分拉在一起，而其他的部分保持分离，从而使多肽链折叠、盘绕成紧密的近似球形的三维构象（图 3—36）。

这里需要指出的是，这些非极性基团相互作用所产生的色散力是稳定蛋白质三维构象的主要作用力。这种色散力称为范德华力。虽然范德华力很弱，但大多数蛋白质都含有 25—35% 的非极性的侧链 R 基团，有的甚至高达

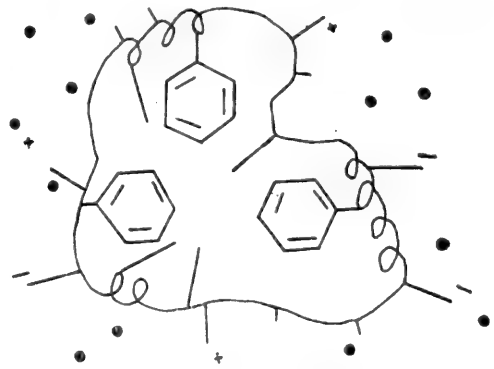
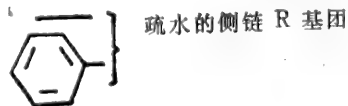
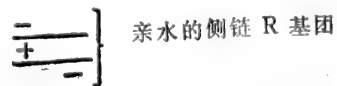


图3—36 亲水作用和疏水作用
· 水分子



50%，这些很弱的力加在一起就变大了。

4. 二硫键

如前所述，二硫键是由肽链中或肽链间的两个半胱氨酸残基的侧链巯基(-SH)氧化形成的。由于半胱氨酸可能存在于多肽链的任何部位，所以二硫键可以把不同部位的肽段连在一起。二硫键对于蛋白质空间构象的稳定也起很重要的作用。

六、两类主要蛋白质的构象

生物体内的蛋白质从形状上可以分为两大类，即纤维状蛋白和球状蛋白。这两类蛋白质在结构上有很大的差别。下面我们将从这两类蛋白质构象来看它们与上面所讨论的几种结构水平有什么联系。

1. 纤维状蛋白

纤维状蛋白是一类不溶于水的蛋白质，是由几条多肽链经侧面交联键交联在一起，构成生物组织的结构成分。因此，纤维状蛋白又称为结构蛋白。可以把纤维状蛋白分为三种不同的类型，胶原蛋白(Collagen)、 α -角蛋白(α -Keratins)和丝蛋白(Fibroin) 分别是三类中最典型的例子。

(1) α -角蛋白

α -角蛋白主要存在于动物的毛、发、指甲等之中。羊毛纤维是典型的角蛋白。早期蛋白质晶体结构的 X-射线晶体衍射主要是以羊毛角蛋白为材料。Astbury 等人曾经用 X-射线晶体衍射法分析了毛、发等一类 α -角蛋白的结构，指出这类蛋白质的结构很相似，沿长轴方向都有一个大周期结构或重复单位。这一重复单位为 $5.0\text{--}5.5\text{ \AA}$ ，与 Pauling 后来提出的 α -螺旋结构的每一个螺旋距离为 5.4 \AA 大致相当；所观察到的小周期则相当于 α -螺旋结构中每个氨基酸残基沿轴线向上平 1.5 \AA 。由此可以看出，所有的 α -角蛋白都是以 α -螺旋结构的形式存在。因此， α -螺旋结构是 α -角蛋白多肽链的基本构象。或者说， α -角蛋白的多肽链的构象与 α -螺旋结构一致，在毛、发等 α -角蛋白中，三条具 α -螺旋结构的多肽链彼此拧在一起，向左扭曲形成与缆绳相似的超螺旋结构(Supercoiled structure)，从而构成 α -角蛋白的基本单位(图3—37)。 α -角蛋白的单股螺旋之间通过二硫键把它们紧紧地维系一起。由于 α -角蛋白中含有很多半胱氨酸，所以众多的二硫键就使得 α -角蛋白很稳定。

在 α -角蛋白中，由于含有很丰富的非极性侧链 R 基氨基酸，故 α -角蛋白不溶于水。

(2) 丝心蛋白(β -角蛋白)

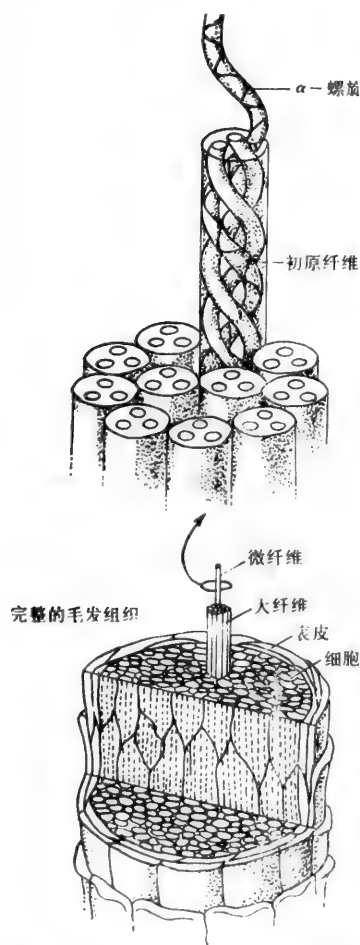


图3—37毛发和毛发 α -角蛋白的结构

蚕丝、蜘蛛丝等丝心蛋白是另外一种类型的不溶于水的纤维状蛋白，属于 β -角蛋白。丝心蛋白的晶体 X-射线衍射图案表明，它的空间结构与 α -角蛋白完全不同，呈现为反平行式的 β -折叠片。在丝蛋白多肽链长轴方向上具有 7.0 \AA 的重复距离，所以丝心蛋白的空间构象是 β -折叠式的。在丝心蛋白中，反平行的 β -折叠片以平行的方式堆积起来，形成多层。每个折叠片的肽链之间是借氢键维系，而片与片之间是靠范德华力维持（图 3-38），

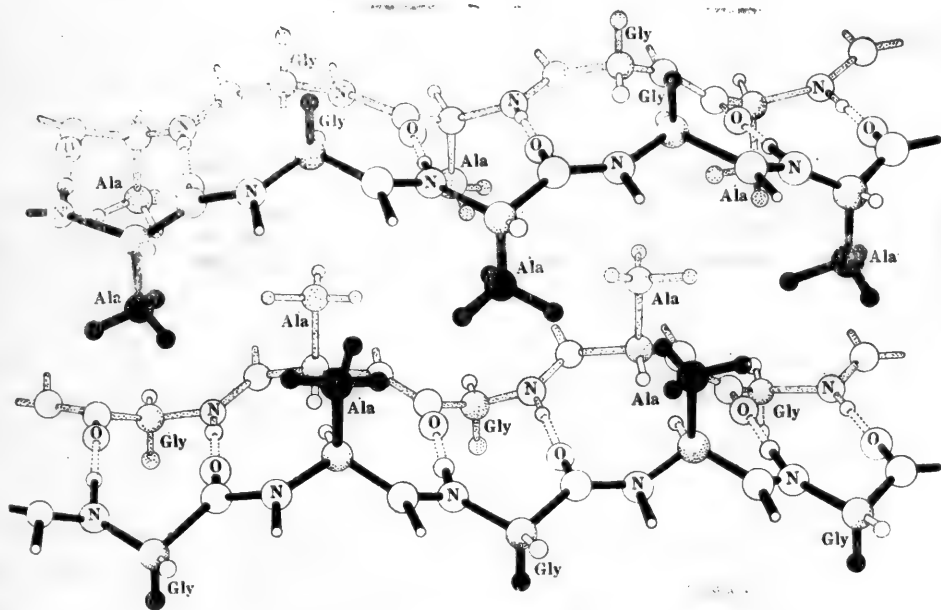
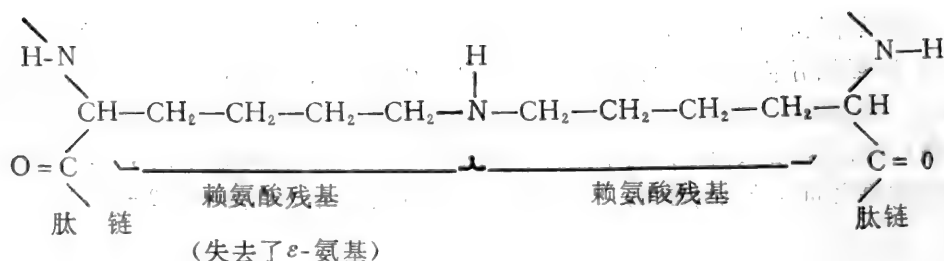


图3-38 丝心蛋白的空间结构

在丝心蛋白中，甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸含量多，约占87%。它的一级结构也很特殊，含有-Gly-Ser-Gly-Ala-Gly-Ala-的重复顺序。由于丝心蛋白缺乏半胱氨酸，所以它的 β -折叠片之间不是用二硫键交联的。由于丝心蛋白呈现 β -折叠的片层结构，故它不能象羊那样被拉长。

(3) 胶原蛋白

胶原蛋白是结缔组织(connective tissue)中最主要的一种蛋白质，约占体内蛋白质总量的30%。胶原蛋白在体内以胶原纤维的形式存在。胶原蛋白分子的基本单位由三条多肽链构成的三股螺旋结构，这种三股螺旋结构也是一种超螺旋结构，因为每条多肽链本身形成了左手螺旋。单根左手螺旋每圈包含3.3个氨基酸残基，螺旋距离为 2.9 \AA ，螺旋半径为 1.6 \AA 。所以这种左手螺旋与 α -螺旋不同。三股螺旋结构是向右旋转的。胶原蛋白的这种三股螺旋也叫做原胶原蛋白(tropocollagen)。每个原胶原蛋白的长度约为 3000 \AA ，分子量约为300,000。这些原胶原蛋白头尾相连，并排成束，形成胶原纤维（见图 3-39）。原胶原蛋白分子的三股螺旋通过氢键以及一种不常见的共价键交联在一起，这种共价键是由两条肽链的赖氨酸残基的侧链基团形成的；



相邻原胶原蛋白也彼此交联在一起。

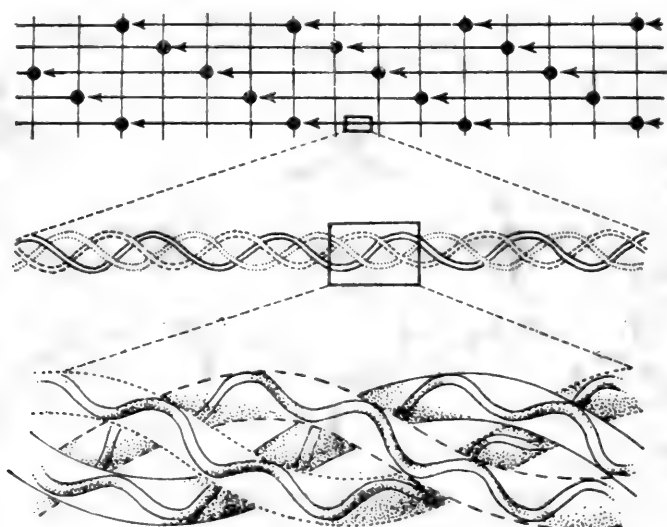


图3-39 胶原蛋白的结构

胶原蛋白的这种特殊的螺旋结构在其他蛋白质中尚未发现。这与胶原蛋白分子的特殊的氨基酸组成有关。在胶原蛋白分子中,甘氨酸的含量大约占33%,丙氨酸约占11%,脯氨酸和羟脯氨酸约占25%;几乎每第三个位置的氨基酸残基都是甘氨酸(—Pro—Gly—X—Pro—Gly—X—Hyp—Gly—Pro—Hyp—Gly—)。这就决定了胶原蛋白特殊的空间构象。胶原蛋白的营养价值很低,因为它的必要氨基酸的含量很少。

2. 球状蛋白(Globular proteins)

球状蛋白的种类占生物体内蛋白质种类的绝大多数。球状蛋白是水溶性的,形状近似球形,结构紧密。球状蛋白质的空间构象比纤维状蛋白要复杂得多,蛋白质的三级结构和四级结构的概念通常与这类蛋白质有关。球状蛋白是生物活性蛋白,例如各种酶和抗体。由于结构与功能之间的内在联系,所以,球状蛋白质的三维构象的研究是分子生物学研究的主要方面。

(1) 肌红蛋白的构象

肌红蛋白(Myoglobin)存在于肌肉中,是由153个氨基酸残基构成的单链蛋白,并含有一

个血红素(heme)辅基, 分子量为17,800。
肌红蛋白在哺乳类动物中执行可逆的氧合与脱氧的作用, 这与红血球细胞中的血红蛋白的功能是相似的。Kendrew 等人用 X-射线衍射法测定了它的空间构象, 揭示出它具有下述几方面的特征:

①多肽链中大约75%的氨基酸残基卷曲成 α -螺旋结构, 其余部分呈现无规卷曲。有8个长度不等的 α -螺旋区。即 A、B、C、D、E、F、G、H, 如图3—40(a)所示。

②由于侧链 R 基团的相互作用, 使得多肽链折叠、盘绕成一个近似球形的三维构象。氨基酸残基的大部分极性侧链 R 基团分布在球状分子的表面; 几乎全部的疏水侧链 R 基团位于分子的内部。整个分子非常紧密, 其内部空间仅能容纳四个水分子。整个分子分两层折叠成 $43 \text{ \AA} \times 35 \text{ \AA} \times 25 \text{ \AA}$ 的球形(图3—40(b))。

③脯氨酸残基都位于拐角处, 其他一些难成 α -螺旋的氨基酸残基如异亮氨酸、丝氨酸、天冬酰胺等也出现在拐角处。

④血红素辅基位于疏水的空穴中, 它通过与肽链中的位于 F 螺旋的 F₈ 组氨酸的咪唑基配位相连。血红素辅基可以与氧配位可逆结合。

(2) 溶菌酶的构象

溶菌酶(Lysozyme)存在于鸡蛋清及动物的泪液中, 它的功能是催化细菌细胞壁上的肽聚糖(peptidoglycan)水解, 从而破坏细菌的细胞壁, 是常用的破细菌细胞的试剂。溶菌酶是由129个氨基酸残基构成的单链蛋白, 其分子量为14,600。1965年, Phillips. 等人测定了溶菌酶的构象(图3—41)。

从图3—41我们可以看出, 溶菌酶呈现为椭球形, 大小为 $45 \text{ \AA} \times 30 \text{ \AA} \times 30 \text{ \AA}$ 。在溶菌酶的构象中, 螺旋结构约占25%, 肽链的大部分呈无规卷曲。在其分子的第41—54氨基酸残基间有一个反平行的 β -折叠结构。另外还有数个 β -转角。整个分子有一个狭长的凹穴。实验证明, 最适小分子底物与酶结合时, 恰好是与酶分子中的长形凹穴相吻合。这个凹穴就是该酶的活性中心部位。酶分子中的四个二硫键对酶的构象的稳定起着重要的作用。溶菌酶的构象看上去并不很紧密。大多数极性侧链 R 基团分布在酶分子的表面, 便于与溶剂分子结

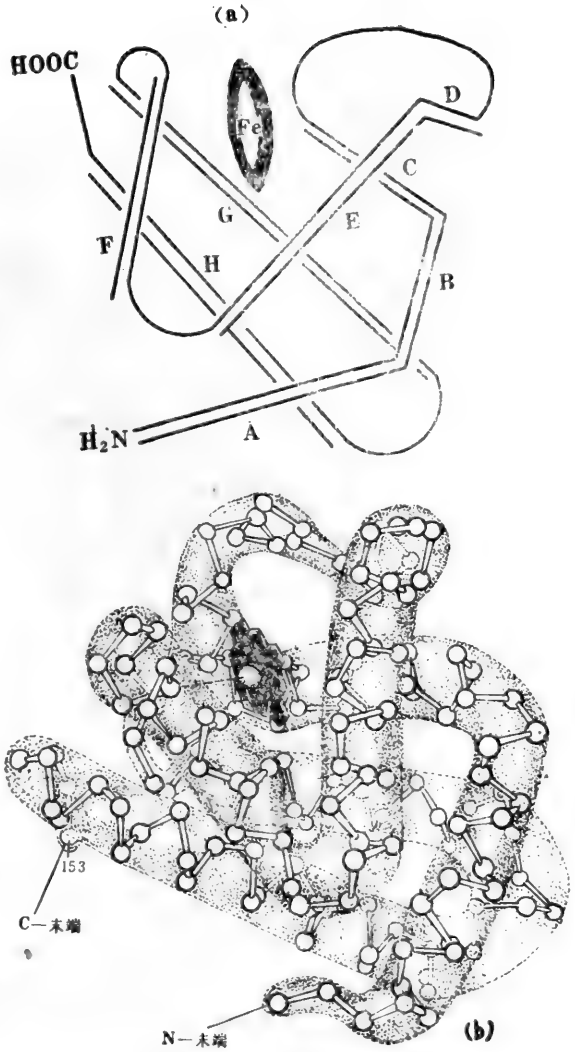


图3—40 (a)肌红蛋白多肽链的八个螺旋区(双线表示螺旋区, 单线表示无规卷曲);

(b)肌红蛋白的三维构象

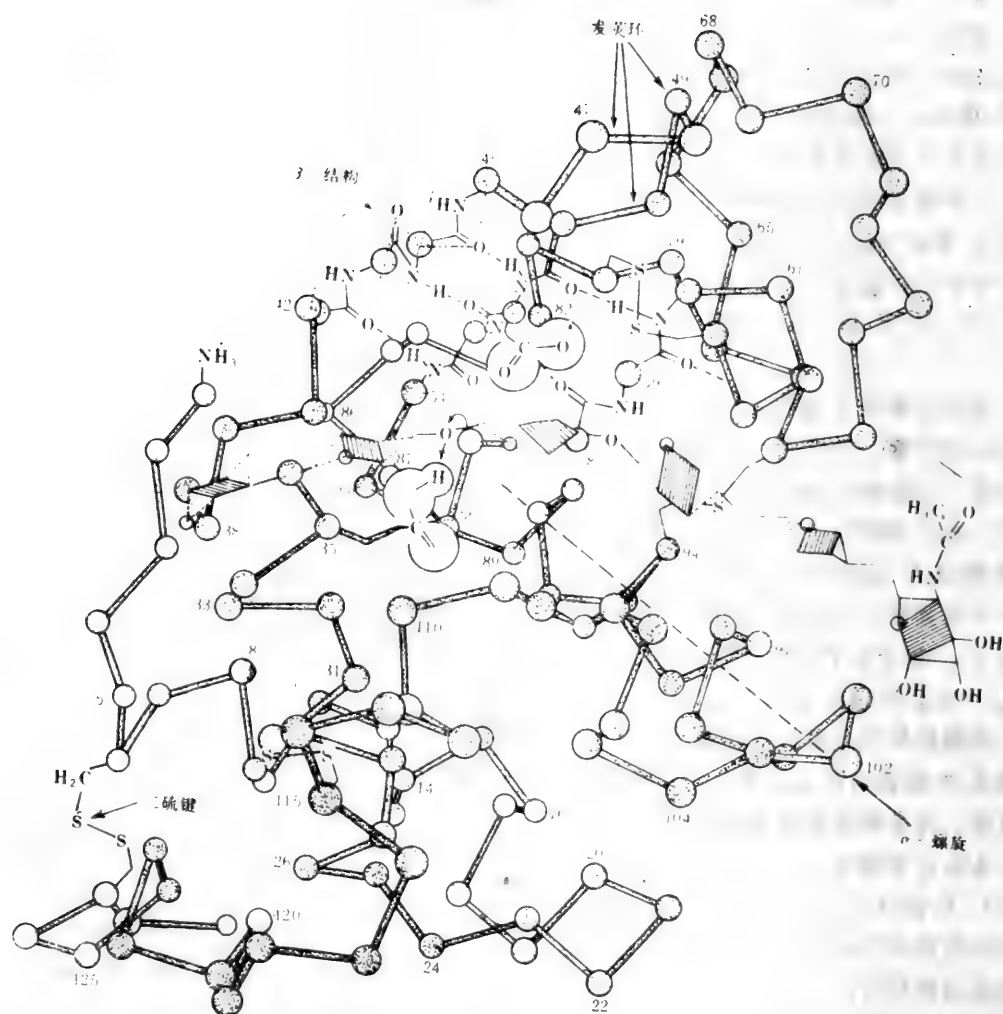


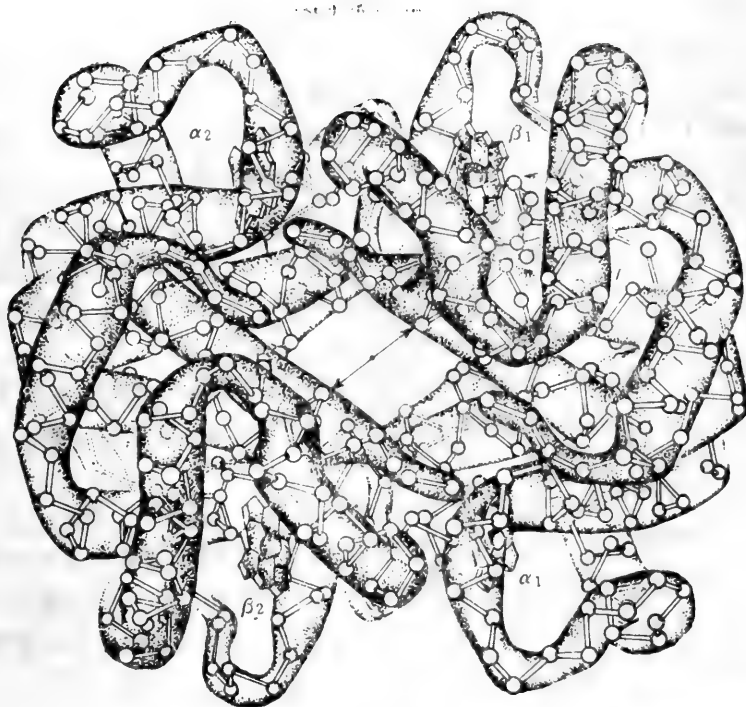
图3-41 溶菌酶的结构(与底物分子结合)

合，大多数非极性的侧链 R 基团位于分子的内部。

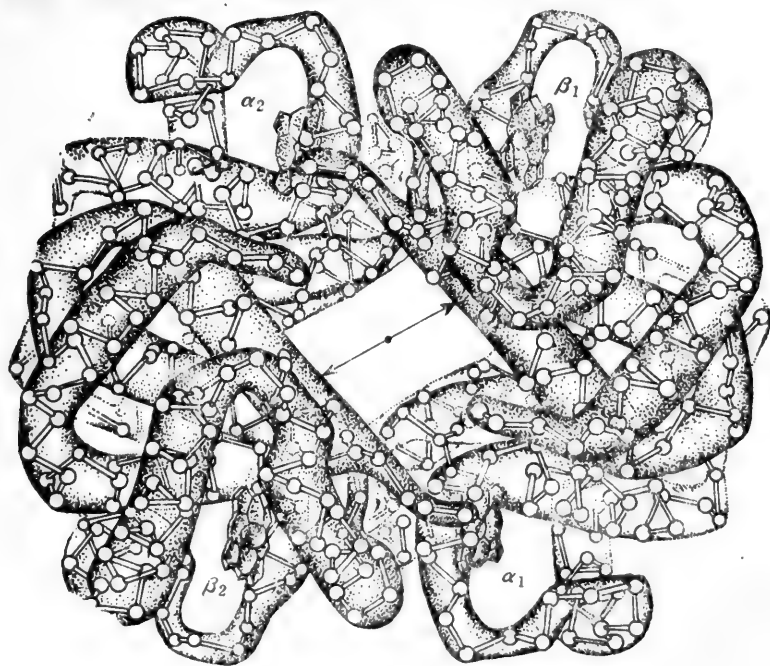
(3) 血红蛋白的构象

血红蛋白 (hemoglobin) 是红血细胞的主要成分。正常成年人的血红蛋白由两个 α -亚基和两个 β -亚基构成。每个 α -和 β -亚基分别由141个氨基酸残基和146个氨基酸残基组成。血红蛋白是一种不均的四聚体寡聚蛋白，它在人体及高等动物体内的主要功能是运输氧气和二氧化碳。1959年，Perutz 测定了血红蛋白的构象。

血红蛋白的每个亚基虽然和肌红蛋白在一级结构上有较大的差别，但在二级结构和三级结构方面却是很相似的。它们的这种相似性反映了它们在功能上的相似性。血红蛋白的每个亚基均以配价键和一个血红素辅基相连。氧分子配位连接在血红素辅基上。在血红蛋白的四级结构中，相同亚基成对角配对。因此，四个亚基占据着四面体的四个角。整个外形呈现



氧合血红蛋白



脱氧血红蛋白

图3-42 血红蛋白的空间结构

为一个结实的近似球形的结构，其直径约为55 Å（图3—42）。

虽然各种球状蛋白质都有自己特殊的折叠法式，但是，根据目前研究过的球状蛋白质，发现它们在构象上还是有一些共同点，这些共同点表现在：

①整个球状蛋白分子呈现为紧密的结构。这种紧密结构是多肽链主链在多种形式的二级结构的基础上沿三维空间折叠形成的，是侧链 R 基团相互作用的总结果。球状蛋白的三级结构不可能由单一形式的二级结构形式，即便是 α -螺旋结构占有75%的肌红蛋白和血红蛋白这类蛋白质的三级结构，要是没有无规卷曲的构象存在，就不可能形成近似球形的三级结构。在球状蛋白分子的三级结构中，在螺旋与螺旋之间、 β -折叠与 β -折叠之间，或者螺旋与 β -折叠之间，往往是由无规卷曲或 β -转角相连。

②在球状蛋白分子中，侧链 R 基团形成特定的侧链构象，即疏水的侧链 R 基团避开水相，在分子内部彼此接近，形成疏水区；极性的侧链 R 基团则由于亲水性而分布在球状分子的表面，形成亲水区。

③在寡聚蛋白质的四级结构中，亚基之间的相互关系与亚基疏水侧链基团的数量有关。这类蛋白质含有大约30%以上的疏水侧链的氨基酸残基。这些氨基酸的疏水侧链基团不可能完全包埋在疏水核中，暴露在外的疏水侧链基团为了避开水相，亚基之间就彼此接近，从而使疏水侧链基团包埋在亚基之间。亚基间的疏水侧链基团的相互作用是维持寡聚蛋白质四级结构稳定的重要因素。

七、蛋白质的氨基酸顺序与空间构象的关系

为什么每一种蛋白质都有它自己特定的空间构象呢？通过对蛋白质一级结构的分析，已

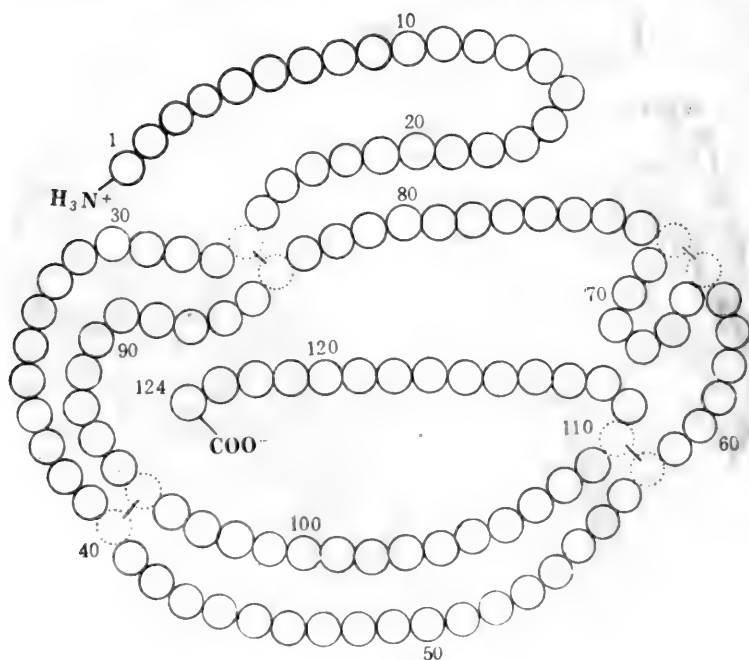


图3—43 核糖核酸酶的一级结构

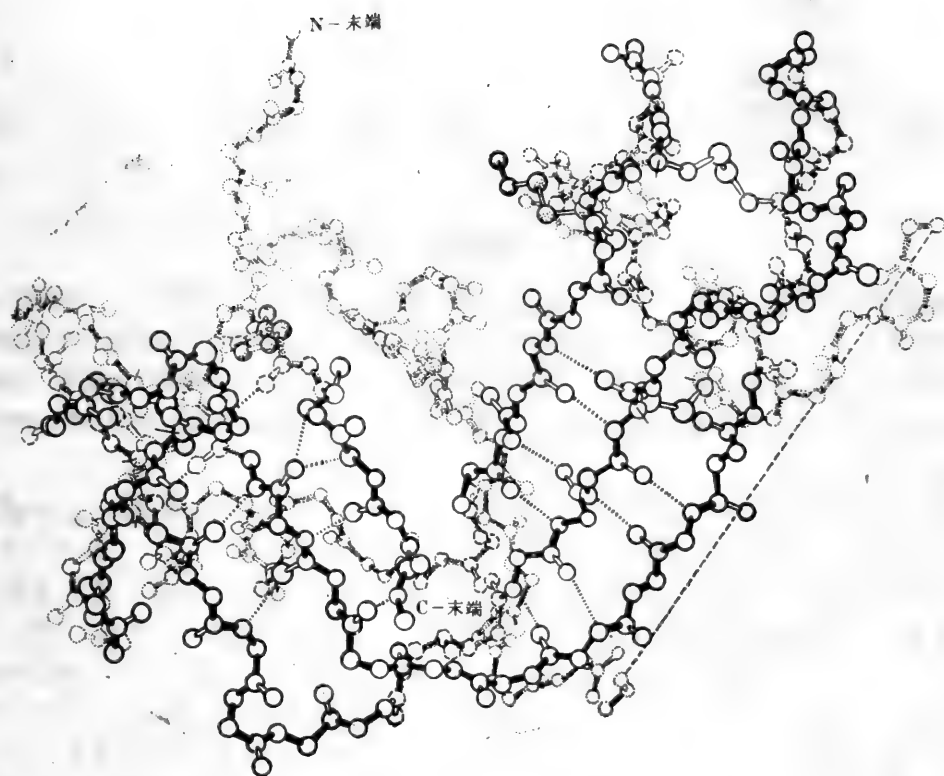


图3-44 胰核糖核酸酶的空间结构
在它的空间结构中 β -折叠清晰可见。

经了解到每一种蛋白质的氨基酸组成及其分子比是不相同的，而且每种蛋白质分子中的氨基酸彼此连接的顺序也是不相同的。只要我们从蛋白质的氨基酸组成及氨基酸顺序的不同来理解蛋白质空间构象的差别，就不难得出蛋白质特定的空间构象是由组成它的氨基酸顺序即一级结构所规定的这个结论。

Anfinsen 在核糖核酸酶 (Ribonuclease) 的复性 (Renaturation) 的研究中，观察到了蛋白质的氨基酸顺序与其构象之间的关系。核糖核酸酶是一种能水解核糖核酸的酶，它是由124氨基酸残基组成的单链蛋白质。这个酶含有四个二硫键，是有活性的酶所必需的。在8mol/L 尿素存在下，用巯基乙醇 ($\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SH}$) 处理天然的核糖核酸酶，分子内的四个二硫键被还原，肽链松散，变成无规线团 (random-coil)，同时酶活性完全丧失。但是，当用透析的方法除去尿素和巯基乙醇后，核糖核酸酶的活性几乎完全恢复。复性后的核糖核酸酶的理化性质与天然的酶完全一样 (图3-45)。如果被还原的无规线团分子中的8

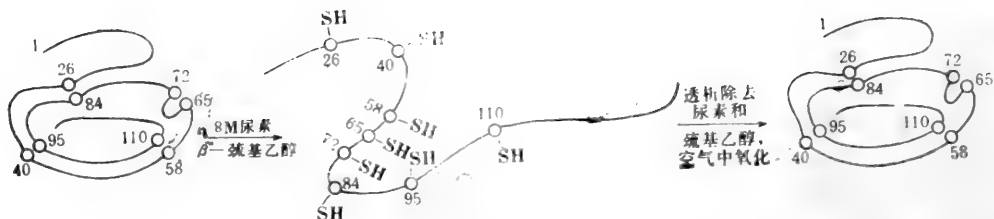


图3—45 核糖核酸酶的变性与复性。

个半胱氨酸的侧链巯基在借空气中的氧重新被氧化、按随机的方式形成四个二硫键时，共有105种连接方式。然而在这105种连接方式中，只有其中一种方式所形成的四个二硫键才是天然酶所选择的，才能表现出天然酶的全部活性。这个实验说明，核糖核酸酶的一级结构即它的氨基酸顺序决定着核糖核酸酶特定的天然构象。核糖核酸酶的天然构象显然是热力学上最稳定的结构。

前面介绍的肌红蛋白的空间构象中有这样的特点，即脯氨酸以及异亮氨酸、丝氨酸、苏氨酸等都出现在转角处，不能参与 α -螺旋的形成。这是为什么呢？因为一条多肽链能否形成 α -螺旋结构，以及形成的螺旋结构的稳定程度怎样与它的氨基酸组成和氨基酸顺序有极大的关系。由于脯氨酸（或羟脯氨酸）的 α -碳原子参与了侧链吡咯环的形成（见图3—46），环内的Ca—N键不能旋转，不可能得到形成 α -螺旋所需要的 ϕ 角。另外，由于脯氨酸残基本身没有—NH基，因而不可能形成维持 α -螺旋结构所需要的氢键。所以，在多肽链中凡是出现脯氨酸或羟脯氨酸的部位很容易产生转角，都不可能形成 α -螺旋结构。异亮氨酸的 β -位碳原子有一个庞大的分枝，造成空间障碍，当有这样的氨基酸出现时， α -螺旋不能有效地形成。苏氨酸、丝氨酸、天冬酰胺等氨基酸形成螺旋的能力弱，当它们连续出现在多肽链中时，就会妨碍螺旋的形成，因而它们很容易造成转角。

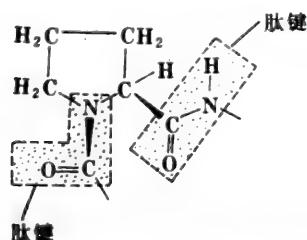


图3—46 多肽链中的脯氨酸残基产生的转角

链只能形成略向左扭曲的左手螺旋。

丝心蛋白含有约50%的甘氨酸残基，且丝氨酸残基的含量亦相当高，在它的氨基酸顺序中，多为Gly-Ser，所以丝心蛋白也不可能存在 α -螺旋结构，只能呈现为 β -折叠的构象。

多肽链侧链R基团的性质对多肽链主链的 α -螺旋的形成与稳定也有较大的影响。如果带有同种电荷的氨基酸残基连续出现在肽链中，由于同种电荷相互排斥，而不能有效地形成螺旋结构。如果带异种电荷的氨基酸残基连续出现在肽链中，由于异种电荷相互吸引，也会使 α -螺旋结构不能有效的形成或者使螺旋失去稳定。若这些带电的侧链基团分散存在，则

不会影响 α -螺旋结构的稳定。

通过对大量已知空间构象的蛋白质结构的比较研究，表明不同的氨基酸有着不同的形成二级结构的趋势（如图 3—47 所示）。这样，我们可以根据某种蛋白质多肽链的一级结构来预测它可能的构象。

综上所述，蛋白质特定的空间构象是由其氨基酸的组成和氨基酸顺序决定的。即是说，规定某种蛋白质的复杂的三维构象所需要的信息包含在它特定的氨基酸组成和特定的氨基酸顺序中，而后者又是编码该蛋白质的基因的核苷酸顺序决定的（见核酸有关章节）。

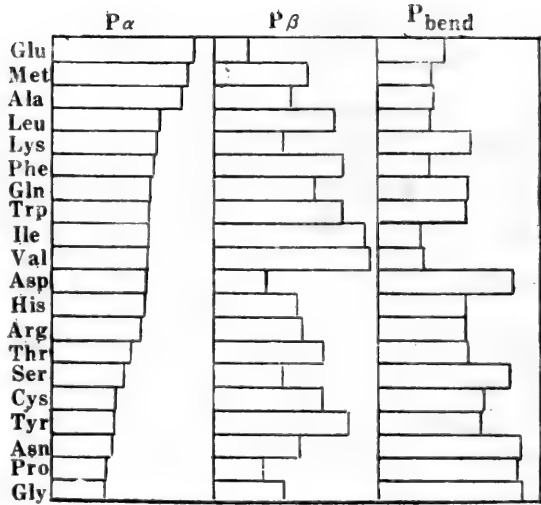


图3—47 氨基酸对形成各种二级结构的影响。

P_{α} ：表示对 α -螺旋形成的影响（从上到下，形成 α -螺旋的能力逐渐减弱）
 P_{β} ：表示对形成 β -折叠结构的影响；
 P_{bend} ：表示对形成 β -转角的影响。

八、蛋白质空间构象与功能的关系

1. 空间构象的破坏对功能的影响

蛋白质特定的生理功能是由它特定的空间构象决定的。蛋白质空间构象被破坏时，它

失去了执行正常生理功能的能力：酶不再作为催化剂，蛋白激素不再起调节代谢的作用；膜蛋白不再作为通透的载体。蛋白质特定的空间构象的破坏伴随有生物活性的丧失，这种现象就叫做蛋白质的变性（denaturation）。蛋白质的变性不涉及它的一级结构的破坏。

蛋白质变性和生物功能的丧失之间的关系可以通过细菌毒蛋白（毒素）加热变性的结果来说明。当细菌毒素加热处理时，大多数毒素失去了它们的致病能力。

蛋白质的空定构象主要是由非极性侧链基团的相互作用以及盐键、氢键等作用力来维系。这些次级键的一个共同的特点是键能很弱，容易受到一些较为剧烈的物理或化学因素的破坏。所以在制备具有生物活性的蛋白质时，应该避免剧烈因素，以免导致蛋白质空间结构的破坏而使其丧失它的生物功能。

2. 蛋白质变性机制

变性的因素有物理因素和化学因素。物理因素包括加热（70—100℃）、紫外线照射、X-射线、超声波、高压、剧烈振荡和强力搅拌。化学因素有：过酸、过碱、高浓度尿素、胍、去垢剂、三氯醋酸、浓乙醇等。

虽然物理化学研究早已证实蛋白质变性包括从有序到无序的转变，但是，变性过程的实际情况并没有很好地了解。主要是因为变性过程包含了一种快速的雪球效应（Snow-balling effect）：一旦次级键有一小部分被破坏，那么其余的次级键就很快断开，随之完整的空间构象很快瓦解，就象已经开始触化的雪球不可阻挡地很快完全融化一样。总的来说，蛋白质的变性主要是由于蛋白质分子内部结构发生改变所引起的。天然蛋白质所以有生物活性，主要是因为分子内部的氢键、盐键以及非极性基团的相互作用等维系着整个分子，使之具有严密的结构，如果变性因素能使上述作用力遭到破坏，蛋白质分子就从原来有序的紧密的结构

变为无序松散的结构。

加热由于分子的热运动使肽链受到过分的热振荡,引起维持分子构象的氢键和范德华力的破坏。酸、碱能改变蛋白质分子中可解离基团的解离状况,从而影响分子内的氢键和盐键的稳定性,过酸过碱均会破坏分子内的氢键和盐键。浓乙醇也许是能进入到蛋白质分子的内部空间,而破坏分子内的氢键。三氯醋酸能使蛋白质带正电荷的基团与它的负离子作用生成盐键而破坏了分子内原有的盐键,使蛋白质变为不溶性盐类。尿素分子由于分子上具有 —NH_2 和 >C=O ,故能与蛋白质肽链争夺氢键使肽链松开而变性。一些去垢剂如十二烷基硫酸钠(SDS)、胆汁酸盐等表面活性剂能破坏蛋白质分子的疏水侧链基团的相互作用,及离子间的相互作用,从而使蛋白质变性或使亚基解离。

蛋白质变性后,其物理性质和化学性质都发生明显的变化。除生物活性丧失外,还有如溶解度降低,分子形状改变,粘度增大,旋光负值增高等变化。溶解度降低的原因在于分子表面结构发生变化,亲水基团相对减少,内部疏水基团大量外露,使蛋白质结合水的能力下降,失去水膜。根据大分子的粘性特征,链状分子比球状分子的粘度大,蛋白质变性后,球状结构伸展为链状结构,所以粘度增大。关于旋光负值的增大还未有明确的解释。一般认为蛋白质的旋光性不仅是由于具有旋光性的氨基酸残基,且而蛋白质的螺旋结构以及其他形式的折叠都有可能影响到蛋白质分子的旋光性。实验证明,蛋白质的比旋度总是负的,而且当它变性后这种旋光负值还会增大。球状蛋白质的比旋度常常在 -30° — -60° 范围内。在过高或过低的pH下,以及在高温处理蛋白质后,其旋光负值增高,并作为蛋白质空间构象被破坏的标志。

变性后的蛋白质易被蛋白酶消化。这是因为变性后,肽链伸展,肽键暴露,便于酶作用。

实验证明,少数蛋白质的变性如不超过一定的限度,经过适当处理后,可以重新恢复蛋白质的性质。这种现象叫做蛋白质的可逆变性。前面提到的核糖核酸酶的复性实验,就是蛋白质可逆变性的最著名的例子。变性是可逆的还是不可逆的,与导致变性的因素、蛋白质的种类和分子结构的改变程度都有关系。

蛋白质的变性在日常生活和实际工作中都具有广泛的应用。如果我们要制备具有生物活性的蛋白质,就需要尽可能地避免能使蛋白质变性的因素;也可以利用蛋白质对变性因素敏感性的差别除去不需要的杂蛋白。高温灭菌、紫外线照射或酒精消毒即利用了这些因素能使微生物细胞内蛋白质变性的原理。

3. 血红蛋白的构象与功能的关系

如前所述,血红蛋白是由两个 α -亚基和两个 β -亚基构成的寡聚体蛋白,它是脊椎动物红细胞中的主要蛋白质,担负着运载氧和二氧化碳以及氢离子的作用。

虽然血红蛋白与肌红蛋白都是氧的载体蛋白质,但是两者的氧合曲线却很不相同(图3—48)。血红蛋白和肌红蛋白对氧的亲合力是用氧的饱和百分数表示的:

$$\text{氧的饱和百分数} = \frac{\text{HbO}_2}{\text{HbO}_2 + \text{Hb}} \times 100\%$$

氧合曲线表示在不同的氧分压下氧的饱和和百分数。从图 3—48，我们可以看出，肌红蛋白对氧的亲和力比较大，因为对于肌红蛋白来说，氧的饱和度达到50%时，氧的分压力只需要 1—2mm 汞柱，而血红蛋白要达到同样的饱和度则需26mm 汞柱的氧分压。另外，我们还可以看出，肌红蛋白的氧合曲线是双曲线，当氧分压达到20mm 汞柱时，其氧的饱和度已超过95%，而处在活动中的肌肉组织毛细血管的氧分压达26mm 汞柱。因此，肌红蛋白不可能有较多的氧释放出来供组织利用。血红蛋白的氧合曲线呈 S 型，只有当血红蛋白处在肺部

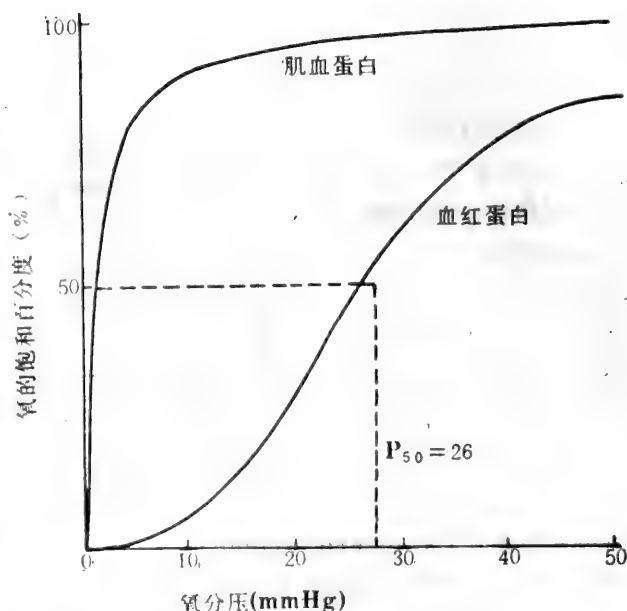


图3—48 血红蛋白和肌红蛋白的氧合曲线

时，它的氧的饱和度才超过95%，因为肺部血管的氧分压大约是100mm 汞柱。当与氧结合的血红蛋白经血流到达肌肉组织时，由于肌肉的氧分压低（休息时也只有约40mm 汞柱），血红蛋白与氧的结合力下降，便释放出较多的氧（在处于活动中的肌肉内可释放50%以上的氧）供组织利用。所以，如果用肌红蛋白代替血红蛋白在肺部和肌肉以及其他组织间经血液运送氧，则这一使命不能完成，因为它与氧的亲和力太高，它从肺部到达肌肉组织中后，只能释放出大约 1—2 % 的氧。肌红蛋白的主要功能是贮存氧以供肌肉细胞线粒体利用。

血红蛋白的氧合曲线表明，该蛋白对第一个氧分子结合的亲和力相当低，但其后对氧分子的结合能力是很高的。从这里我们可以看到，当血红蛋白的第一个亚基结合氧后，便把这种（结合氧的）信息很快传递给其余的亚基，极大地提高了其余亚基对氧的亲和力。在血红蛋白四个亚基之间的这种传递信息的作用是一些亚基之间相互协同作用的结果。这里氧分子是配体（ligand）。当分子中的一个结合部位在结合一个配体后，若更加有利于配体分子与剩余结合部位结合，则这种现象就称为正协同效应（Positive cooperativity）。若在结合一个配体之后，降低了其余结合部位结合配体的能力，这种现象则称为负协同效应（negative cooperativity）。血红蛋白同氧分子的结合具有正协同效应。肌红蛋白因只含一个结合氧分子的部位，故其氧合曲线只能是双曲线。

血红蛋白的 X-射线晶体衍射图案分析表明，脱氧（未与氧结合的）血红蛋白（deoxyhemoglobin，缩写为 Hb）与氧合（与氧结合的）血红蛋白（oxyhemoglobin，缩写为 HbO₂）的四个亚基在三级结构上并无明显的区别，但在四级结构上即亚基的相互关系上有明显的变化。血红蛋白紧密的四级结构是由亚基之间的带电基团所形成的盐键以及氢键维系的。据分析，血红蛋白的四个亚基之间形成了八个盐键，这些盐键对血红蛋白的功能变化有很重要的

作用。在脱氧血红蛋白中，四个亚基的末端被盐键锚住，不能自由转动（图3—49）。所以脱氧血红蛋白是一个严密的被束缚的分子。而当氧结合在血红蛋白上后，盐键断开，四个亚基之间的关系发生了变化。血红蛋白就是通过亚基之间的这种构象变化来完成氧的运输的。蛋白质在表达功能的过程中构象发生变化的现象就叫做别构效应或变构效应（allosteric effect）。

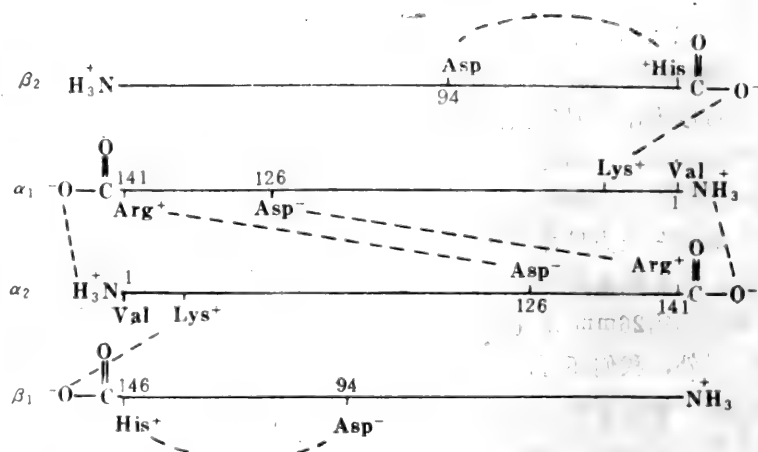


图3—49 （脱氧）血红蛋白的四个亚基被八个盐键束缚成一个严密的结构。虚线表示盐键

脱氧血红蛋白和氧合血红蛋白的构象变化是怎样产生的呢？

血红蛋白的别构效应受到许多因素例如氧分压、 H^+ 离子浓度、 CO_2 的浓度以及二磷酸甘油酸（DPG）等的影响。

血红蛋白的每个亚基都含有一个血红素辅基。血红素中的铁离子(Fe^{2+})具有六个配位，其中四个是与卟啉环上的 N 形成配位，第五个是与亚基多肽链上的一个组氨酸侧链咪唑基形成配位，第六个配位是氧结合的位置。在脱氧血红蛋白中，铁离子距离血红素卟啉环平面 0.75 \AA ，其原因是铁离子的直径对于卟啉环平面的中心孔来说太大。在 α -亚基中，由于氧结合部位没有空间障碍，因此 α -亚基能首先与氧结合。可是在 β -亚基中， E_{11} 位上的缬氨酸的侧链对氧结合部位有空间障碍，使它不能先与氧结合。在氧分压比较高时，由于氧分子

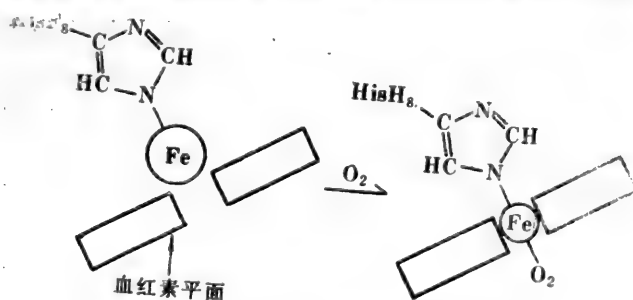


图3—50 当氧化合发生时，铁离子移动进入到卟啉环平面中心孔内

同 α -亚基上的铁离子结合，铁离子的外层电子发生重排，其直径变小了一些。于是铁离子就移入到血红蛋白的血红素卟啉环平面的中心孔内（图3—50），并把与它相连接的 F_8 组氨酸残基拖向卟啉环平面，血红素辅基和 F_8 组氨酸残基就会与其他一些侧链基团密切接触，从而使 F 螺旋、EF 拐角以及 FG 拐角的结构发生变化。

F_8 组氨酸残基的移动引起同一亚基的三级结构发生微小的变化（图3—51(a)），螺旋 F 移向螺旋 H，并把它们之间的“口袋”收拢。这样就导致 H 螺旋 C-端第二个氨基酸（Tyr）排出到“口袋”之外，并拖住与它邻近的 C-末端精氨酸残基（图3—51(b)）。这样的移动很重要，因为在脱氧血红蛋白中的 α -亚基的羧基端残基与其他亚基上的残基的侧链相互作用形成了盐键。氧合化的 α -亚基上的酪氨酸残基从 H 螺旋和 F 螺旋之间的“口

袋”排出后就打断了亚基之间的盐键，从而使整个血红蛋白分子的亚基之间的相互关系发生变化，即四级结构失去稳定。这样，在一个氧合化的亚基内的构象变化转换成亚基之间的界面上的构象变化。由于盐键的断裂，四个亚基彼此松开， β -亚基的构象也发生了一定的变化，消除了E₁₁缬氨酸残基侧链对氧结合部位的障碍，于是其他两个或三个亚基上的血红素对氧结合的速度迅速加快。所以血红蛋白与氧结合的曲线呈现为S型。这也就是氧分压高，血红蛋白对氧亲和力大的原因。

氢离子浓度升高和二氧化碳浓度的增

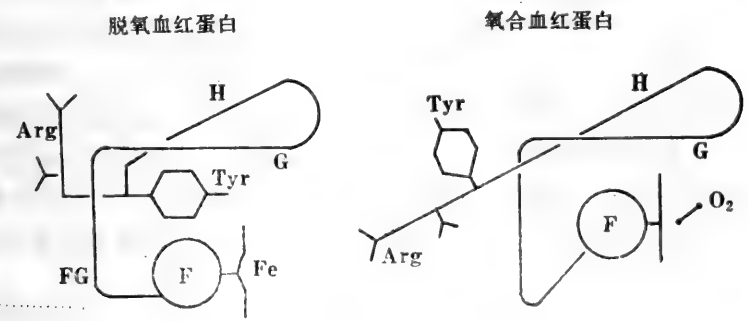
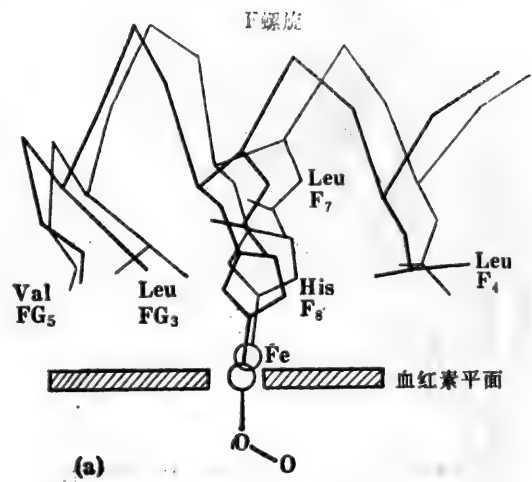
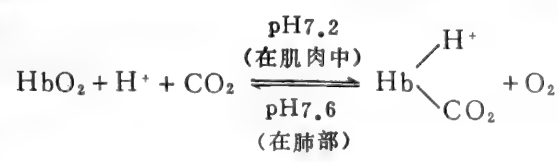


图3—51 α -亚基构象的微小变化

高会降低血红蛋白对氧的亲和力，促使氧合血红蛋白释放出氧（图3—52）。反之，则促进氧合血红蛋白的形成。这种现象是 Bohr 于1910年发现的，故称为 Bohr 效应。



氢离子(H^+)浓度的改变，即 pH 值的改变，必然会引起血红蛋白分子中有关侧链基团的解离。由于组氨酸残基侧链咪唑基的 pK_a 值 接近生理 pH，故组氨酸残基的咪唑基的解离状况首先受到影响。由于亚基中的某些组氨酸残基的咪唑基在脱氧血红蛋白中参与了亚基间的盐键形成，起着稳定脱氧血红蛋白构象的作用。当生理 pH 值从 7.6（在肺部）降低到 7.2（在肌肉中）时，咪唑基质子化程度增高，可以增大脱氧血红蛋白的稳定性，阻止向氧合血红蛋白构象的转移，因此就降低了血红蛋白对氧的亲和力，在肌肉组织中有利于氧的释放。

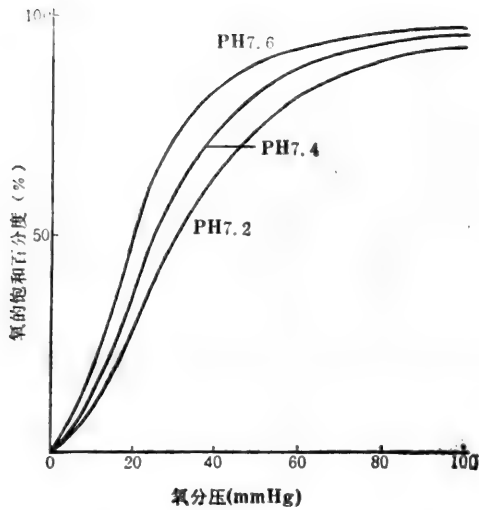
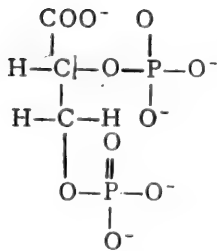


图3—52 氢离子浓度对血红蛋白氧合能力的影响

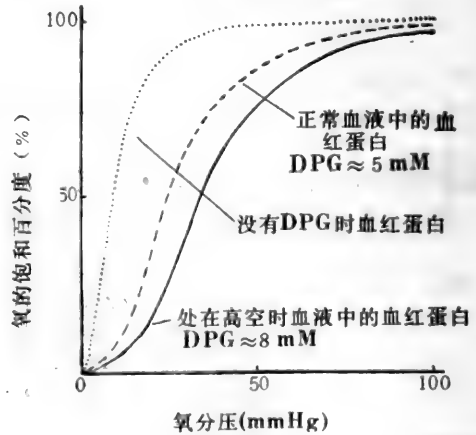
CO_2 浓度对血红蛋白氧合能力的影响与 H^+ 浓度相似。当氧合血红蛋白因肌肉中氧分压低而释放出氧分子变成脱氧血红蛋白后，便与一部分氢离子和 CO_2 结合返回到肺部。

二磷酸甘油酸 (DPG) 是红细胞中糖代谢的中间产物，也是血红蛋白运输氧的一种重要的调节物。二磷酸甘油酸的结合部位是在血红蛋白四个亚基之间的中间孔穴内。这个中间孔穴含有带正电荷的侧链基团 (例如 β -亚基的 His2、Lys82 以及 His143 的侧链基团)。二磷酸甘油酸在生理 pH 条件下带负电荷 (图3—53(a))。当二磷酸甘油酸结合到血红蛋白



2,3-二磷酸甘油酸

(a)



(b)

图3—53 (a): 二磷酸甘油酸的结构

(b) 二磷酸甘油酸对血红蛋白氧合能力的影响

中间孔穴中后，通过它把两个 β -亚基紧紧地连在一起，强烈地稳定脱氧血红蛋白的构象，阻止向氧化化的构象转变，从而导致对氧亲和力的降低 (图3—53(b))。每个血红蛋白分子可结合一分子的二磷酸甘油酸。当二磷酸甘油酸的浓度处在生理水平上时，血红蛋白氧的饱

和度达50%所需的氧分压约为26mm汞柱，这与活动着的肌肉组织毛细血管的氧分压相似，因而有利于氧合血红蛋白释放出氧。在肺部，毛细血管的氧分压高达约100mm汞柱，血红蛋白对氧的亲合力增高，氧化合作用发生，并伴随着血红蛋白构象发生变化，中间孔穴变小，而将二磷酸甘油酸排斥出去，有利于血红蛋白的氧化。当海拔高度升高时，例如高山或高空，人体红细胞中的二磷酸甘油酸水平升高，被血红蛋白结合的量也随之升高，使血红蛋白对氧的亲合力降低。在这种情况下，因大气中的氧分压降低，组织中的氧分压也相应降低，有利于氧合血红蛋白释放出氧，供组织利用。

综观上述分析，我们不难看出，氧分压、 H^+ 浓度、 CO_2 的浓度以及二磷酸甘油酸浓度等的变化影响血红蛋白对氧的亲合力，是由于上述因素引起了血红蛋白的空间构象发生变化的结果。由此，我们可以进一步看到结构和功能的统一性。

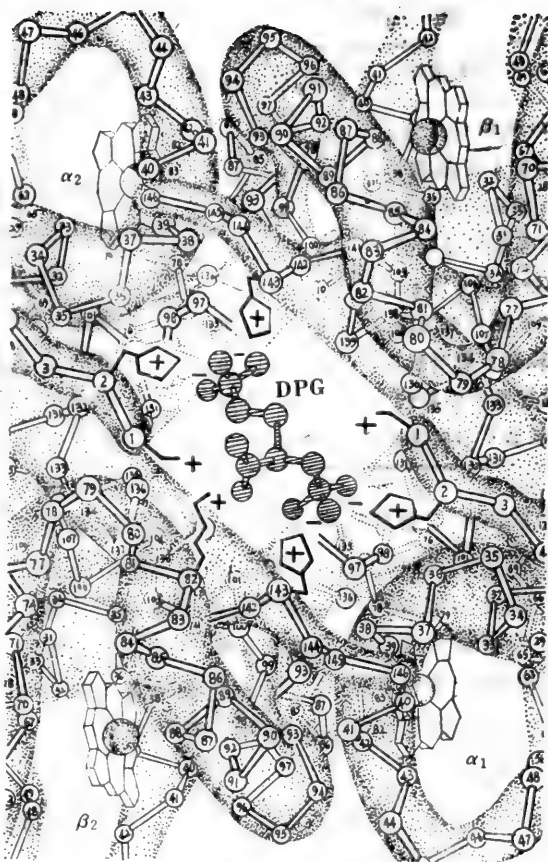


图3—54 DPG 与血红蛋白的结合

第五节 蛋白质的性质及其分离纯化

由于蛋白质是由氨基酸组成的，因而它具有某些与氨基酸有关的性质。但它与氨基酸有着质的区别，表现出单个氨基酸所未有的性质。认识和理解蛋白质在溶液中的性质，对于蛋白质分离、纯化工作以及研究蛋白质的结构与功能的工作都是极为重要的。在这里，我们在介绍蛋白质有关性质的时候，结合讨论蛋白质分离提纯的几种基本的方法。

一、蛋白质的两性解离性质

1. 蛋白质是两性电解质

蛋白质是由氨基酸组成的，而氨基酸是两性电解质，虽然蛋白质多肽链中的氨基酸的 α -氨基和 α -羧基都已结合成肽键，但是N-末端和C-末端仍具有游离的 α -氨基和 α -羧基。组成蛋白质的许多氨基酸具有可解离的侧链基团，这些可解离的侧链基团包括谷氨酸的 γ -COOH、天冬氨酸的 β -COOH、赖氨酸的 ϵ - NH_3^+ 、精氨酸的胍基以及组氨酸的咪唑基等。这些侧链基团在一定的pH条件下可以释放或接受 H^+ ，它们构成了蛋白质两性解离的基础。

表3—5 蛋白质分子中可解离基团的 pK'_a 值

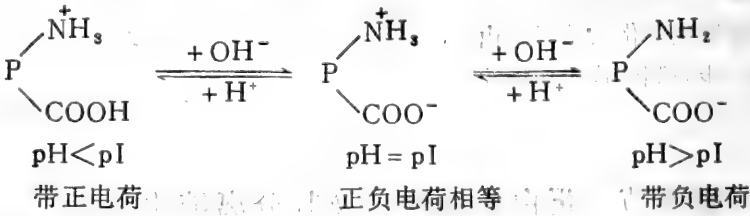
可解离基团	pK'_a 值 (25°C)
α -羧基 (末端)	3.0—3.2
β -羧基 (天冬氨酸)	3.0—4.7
γ -羧基 (谷氨酸)	≈ 4.4
咪唑基 (组氨酸)	5.6—7.0
α -氨基 (末端)	7.6—8.4
ϵ -氨基 (赖氨酸)	9.4—10.6
胍基 (精氨酸)	11.6—12.6
酚羟基 (酪氨酸)	9.8—10.4
巯基 (半胱氨酸)	$\approx 8-9$

基于上述两方面的理由，所以我们说蛋白质是两性电解质。

蛋白质分子可解离基团的 pK'_a 值列于表3—5。这些数值与氨基酸处于自由状态时测定的结果有些差别。因为在蛋白质多肽链中，侧链可解离基团的解离受到邻近带电基团的影响，故与处于单个自由状态的氨基酸的侧链基团的解离有所不同。天然球状蛋白质的可解离基团大部分分布在球状分子的表面，可以被滴定。但位于分子内部的或参与氢键形成的可解离基团不能被滴定，只有当这类蛋白质变性、肽链伸展后才能被滴定。

既然蛋白质是两性电解质，它就应具有两性电解质所特有的性质——等电点。蛋白质与氨基酸一样，

在酸性溶液中解离成带正电荷，在碱性溶液中解离成带负电荷，而在某一特定的 pH 值时，蛋白质分子上所带的正电荷数与负电荷数正好相等，当电场通以直流电时，它既不向正极移动，也不向负极移动，表现出总的净电荷为零，此时溶液中的 pH 值即为该蛋白质的等电点。当某蛋白质所处溶液的 pH 值小于它的等电点时，它就带正电荷，向负极移动，当溶液的 pH 值大于它的等电点时，它就带负电荷，向正极移动。根据上述情况，蛋白质在不同 pH 值的溶液中的带电状况可用下式表示：



应该说明的是，在缓冲液中，处在等电 pH 的蛋白质，其分子上的正负电荷并不完全是由蛋白质本身正电荷基团和负电荷基团所贡献的。蛋白质不仅同 H^+ 结合，而且也同溶液中的其他离子结合。由于这些被结合离子的种类和性质不同，因而使它们之间因亲和力的不同而建立起一种新的离子平衡关系，所以使得等电型离子存在的 pH 位置有所移动，直接影响了等电 pH 值。在不同缓冲液离子强度下，就会有不同的等电型离子的 pH 值，也就是说，会有不同的等电点。因此，等电点并不是一个恒定值，它依赖于所用的缓冲液的离子的性质和浓度。在给出某种蛋白质的等电点时，要指明在何种缓冲液条件下测定的。

每种蛋白质都具有它特定的等电点，这与它所含的氨基酸的种类和数量有关。这就是说与它所含的酸性氨基酸和碱性氨基酸的比例有关。含酸性和碱性氨基酸残基数目相近的蛋白质，属于中性蛋白，其等电点大多为中性偏酸。含碱性氨基酸残基较多的蛋白质，属于碱性蛋白质，其等电点偏碱。含酸性氨基酸残基较多的蛋白质，属于酸性蛋白质，其等电点偏酸。大多数蛋白质的等电点是在 5.0 左右。表3—6示出几种蛋白质的等电点。

所有的蛋白质，不管它具有什么样的特殊功能，都能在细胞内起一定的缓冲作用。因为它们含有众多的可解离的弱酸性和弱碱性的基团，当细胞环境的 H^+ 浓度有所变化时，这些弱酸性和弱碱性基团就具有释放或缔合 H^+ 的能力，从而起到一种天然缓冲剂的作用。

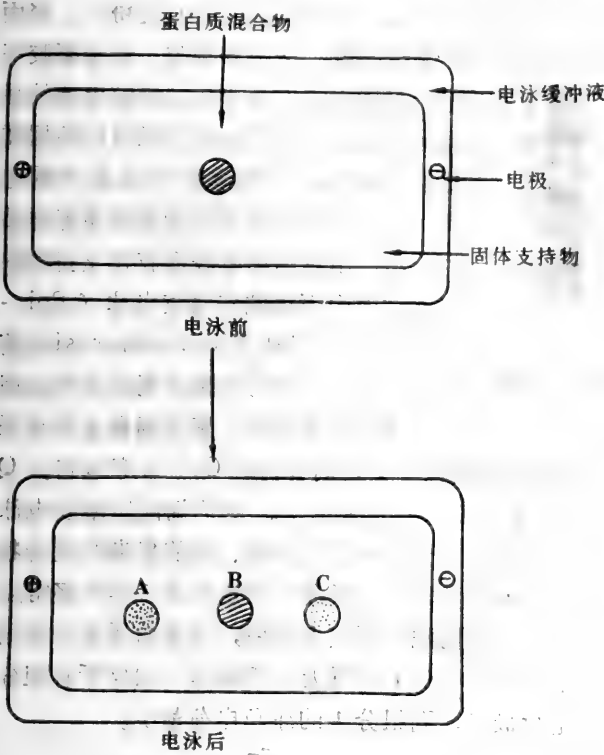


图3—55 蛋白质的电泳分离

表3—6 某些蛋白质的分子量和等电点

蛋白质	分子量	pI*
细胞色素C	13,000	10.6
核糖核酸酶	14,000	7.8
肌红蛋白(马)	17,000	7.0
生长激素(人)	21,500	6.9
羧肽酶	34,000	6.0
胃蛋白酶	35,500	<1.0
卵白蛋白(鸡)	40,000	4.6
血红蛋白(马)	65,000	6.9
血清白蛋白(人)	66,500	4.8
γ-血清球蛋白	160,000	6.4—7.2
过氧化氢酶	250,000	5.6
血纤维蛋白原	330,000	5.5
脲酶	480,000	5.1
甲状腺球蛋白	660,000	4.6

* 处在等电值的 pH 态状

蛋白质的上述电解质性质构成了建立分离纯化蛋白质的方法的基础。下面我们将介绍几种利用蛋白质电学性质的差别来分离纯化它们的方法。

2. 蛋白质的电泳分离

带电质点在电场中向电荷相反电极移动的现象就称为电泳。电泳技术已成为分离蛋白质以及其它可电离物质的一种重要的技术。带点质点在电场中电泳移动的速度和方向主要取决于它们所带电荷的正负性、电荷的数目、颗粒大小和形状。一般来说，颗粒所带净电荷量愈多，颗粒愈小，并且是球形，则泳动速度快，反之则慢。由于各种蛋白质的等电点不同和颗粒大小各不相同，在同一 pH 条件下各具不同的带电性，在电场中泳动的方向和速度也各不相同，这样就可以把蛋白质混合液中各种蛋白质分离开。

目前，在蛋白质的研究中经常应用的电泳技术基本上是在区带电泳法的基础上发展起来的。将蛋白质溶液（或其他含带电质点的溶液）点在润有缓冲液的固体支持物上进行电泳，不同组分形成几个区带，故称为区带电泳。常用的区带电泳技术有：纸电泳、醋酸纤维薄膜电泳、凝胶电泳以及等电聚焦等。

纸电泳是以滤纸为支持物的电泳方法。此法简便，但滤纸对样品的吸附作用较大，电泳时间长。醋酸纤维薄膜电泳是以醋酸纤维薄膜为支持物的电泳方法。在醋酸纤维薄膜上进行电

泳比在滤纸上效果更好，电泳图谱清晰，定量准确，而且时间又短，某些用纸电泳不能分离的蛋白质样品如胎儿甲种球蛋白（AFP），用醋酸纤维薄膜电泳能分离得很清晰。所以醋酸纤维薄膜已日渐取代滤纸成为电泳技术更有用的支持物。

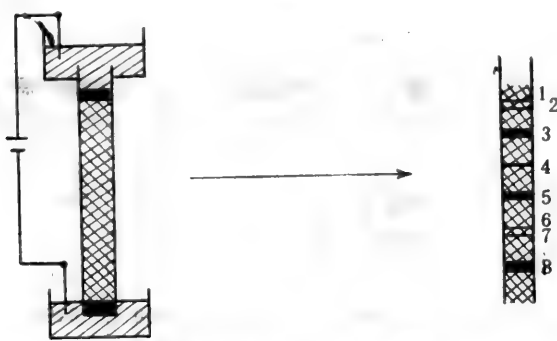


图3—56 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质样品（上端为负极，下端为正极）

凝胶电泳是以凝胶（淀粉胶、聚丙烯酰胺凝胶、琼脂糖凝胶、琼脂凝胶等）为支持物的电泳方法。凝胶电泳的最大优点是凝胶支持物的孔径可以根据需要予以选择，因而适用于带有相同电荷，但大小和形状不同的蛋白质等样品的分离。用聚丙烯酰胺凝胶作支持物的电泳称为聚丙烯酰胺凝胶电泳（Polyacrylamide Gel Electrophoresis，简称PAGE）。均匀的聚丙烯酰胺可以浇灌成薄层板或管状。聚丙烯酰胺的交联

的化学结构提供了一种多孔的网状物，允许带电的颗粒根据它们各自的 Q/r 值穿过它。 Q 代表带电分子所具有的净电荷， r 是带电分子的半径（以厘米表示）。聚丙烯酰胺凝胶电泳具有很多优点，如操作简便、快速、分辨率高、对被分离的物质无损害、能使复杂的混合物解析成为单个的组分。因此，在样品的分离、纯度的鉴定、分子量的测定等项工作中经常应用这一方法。图3—56表示一蛋白质混合样品经聚丙烯酰胺凝胶电泳后，各蛋白质组分依据它们各自的迁移率（即 Q/r 值）而彼此分开。组分8比组分1有更大的迁移率。如果所有组分的大小相同或几乎相同，那么组分8的净负电荷最多，而组分1的净负电荷最少。

在聚丙烯酰胺凝胶电泳的基础上发展起来的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）在蛋白质的分析中是一种很有用的方法。SDS（十二烷基硫酸钠）是一种带负电荷的阴离子去垢剂，分子式是 $CH_3-(CH_2)_{10}-CH_2-O-SO_3^-N^+$ 。在电泳之前用SDS处理蛋白质样品（纯的或混合的），SDS能拆散蛋白质的折叠结构，然后沿着伸展的多肽链的表面吸附。吸附在肽链上的许多带负电荷的SDS分子使该肽链带净负电荷。而且吸附的SDS的量与肽链的大小成正比。其结果是，不同大小的多肽链将含有相同或几乎相同的 Q/r 值。由于聚丙烯酰胺凝胶基质具有筛分的能力，所以较小的多肽链将比较大的具有相同 Q/r 值的多肽链移动得更快。根据这个原理，可以用此方法测定蛋白质的分子量（图3—57）。图3—57中的斜线是用已知分子量的蛋白质的迁移率（“●”点）相连而成的。比较未知大小的蛋白质的迁移率（“⊙”点）即可知该蛋白质的分子量为25,000。当然，所有蛋白质的迁移率都是在相同的条件下测定的。

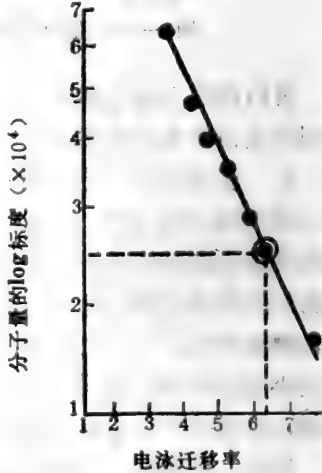


图3—57 SDS—PAGE测定蛋白质的分子量

3. 蛋白质的离子交换层析

利用蛋白质带电性质的差别作为分离依据的另外一种方法就是离子交换层析法。用于蛋白质分离纯化的离子交换剂多是纤维素离子交换剂。常用的阳离子交换剂有弱酸性的羧甲基纤维素(CM-纤维素)；常用的阴离子交换剂有弱碱性的二乙氨基乙基纤维素(DEAE-纤维素)。这些交换剂对蛋白质的交换容量较大，并有较好的通透性。带一定电荷的蛋白质样品与离子交换纤维素的带正电荷或带负电荷的基团结合。蛋白质样品同离子交换纤维素的结合力取决于彼此间的相反电荷基团的静电吸引力，而这种相互吸引力又与溶液的 pH 有关，因为 pH 决定离子交换剂与蛋白质的解离程度。盐类的存在可以降低离子交换剂的离子基团和蛋白质相反电荷基团之间的静电相互吸引。因此，对蛋白质混合物的洗脱分离可由改变洗脱液中盐类离子强度和 pH 来完成。对离子交换剂结合力最小的蛋白质首先从层析柱上洗脱下来。

羧甲基纤维素一般最适合于分离等电点大于 7 的蛋白质。羧甲基纤维素先用比较低的离子强度和 pH 约为 5.0 的缓冲液饱和，蛋白质样品也用同样的缓冲液溶解，并上样到纤维素层析柱上。在这样的条件下，羧甲基纤维素带有固定的负电荷，而蛋白质带有净正电荷，被阳离子交换剂结合。提高 pH 将减少蛋白质的净正电荷，可用逐步提高缓冲液的 pH 值的方法来洗脱，也可以用逐步提高缓冲液的离子强度的方式洗脱（图3—58）。

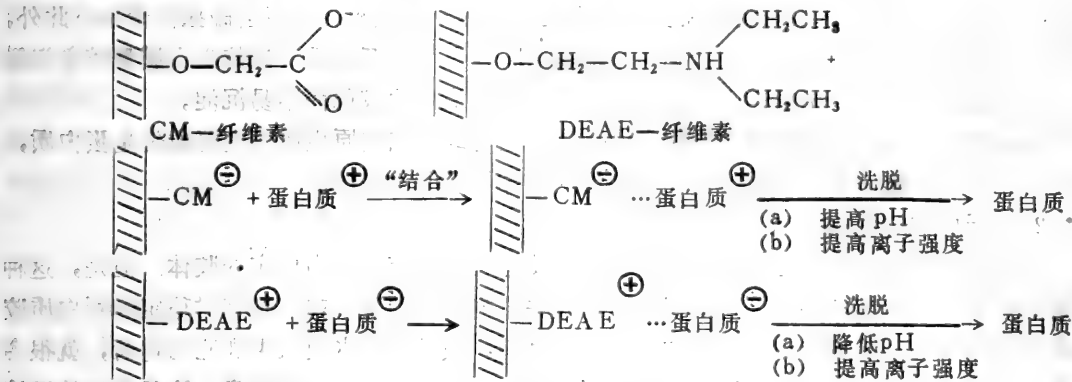


图3—58 用离子交换法分离蛋白质

结合力小的蛋白质先被洗脱下来。

DEAE-纤维素最适合于分离等电点小于 7 的蛋白质。DEAE-纤维素先用离子强度较低、pH 约为 8 的缓冲液平衡，蛋白质也溶于同样的缓冲液中，上样到纤维素柱上。在这样的 pH 下，DEAE-纤维素大部分解离，并且带有固定的正电荷，而蛋白质带有净负电荷，将被阴离子交换剂结合。pH 下降时，蛋白质分子上的净负电荷也要减少。它可用递减缓冲液的 pH 方式进行洗脱，也可用改变缓冲液的离子强度的方式进行洗脱（图3—58）。

4. 等电点法

蛋白质是带有正负电荷基团的两性电解质，所带电荷的种类和数量取决于蛋白质的种类和溶液 pH 的值。每种蛋白质都有它特有的等电点。若溶液 pH 值高于它的等电点，则它带负电荷；若溶液 pH 值低于它的等电点，则它带正电荷。带电分子的溶解度比中性分子的溶解度高。所以，对于大多数蛋白质来说，它的溶解度在其等电点附近的 pH 时达到最小，即就是说，蛋白质分子之间的静电斥力最小，容易相互聚集沉淀析出。可以利用蛋白质在其等电

点状态溶解度最小，容易沉淀析出的特性以及各种蛋白质等电点的差异，从一混合蛋白质溶液中分离出不同的蛋白质。

二、蛋白质的胶体性质与蛋白质的沉淀分离

1. 蛋白质的胶体性质

按照胶体化学的概念，胶体是这样定义的：即把物质为 1nm — 100nm 的粒子在介质中分散所成的体系称为胶体。根据胶体物质的溶解性质可分为亲水胶体和疏水胶体两类。蛋白质的分子量一般在 $10,000$ — $1,000,000$ 之间，其颗粒直径介于胶体颗粒大小之间。由于蛋白质分子颗粒表面分布着许多亲水的极性基团，它在水溶液中所处的行为与亲水胶体一样。所以，蛋白质是一类亲水胶体物质，它具有亲水胶体所具有的性质，如扩散慢、不能透过半透膜、粘性大、流动性差等。

蛋白质分子颗粒大，在溶液中具有较大的表面，而且表面分布有各种极性基团（这是多数）和非极性基团（这是少数），因此对许多物质有吸附能力。极性基团易与水溶性物质结合，非极性基团易与脂溶性物质结合。当蛋白质与水相遇时，蛋白质颗粒表面众多的极性基团就会与水分子结合，在它的颗粒表面形成一层密度较厚的水膜或称水化层。每克蛋白质可结合 0.4 克左右的水。水膜的存在使蛋白质颗粒相互隔开，颗粒之间不会碰撞而聚集。此外，在非等电点状态时，蛋白质颗粒带有同种电荷，同种电荷相互排斥，也使蛋白质颗粒之间保持一定的距离，不致互相聚集，因此，蛋白质在水溶液中比较稳而不易沉淀。

蛋白质的亲水胶体性质对生物体来说是非常重要的。细胞原生质的主要成份是蛋白质，所以，原生质的胶体状态主要是由于蛋白质的胶体性质所造成的。

2. 蛋白质的沉淀分离

正是由于蛋白质颗粒带有电荷和水膜，才使它在水溶液中成为稳定的胶体。但是，这种稳定性是相对的、有条件的。当改变条件，除去这些稳定因素，就使这相对稳定的蛋白质胶体转化为不稳的。若向蛋白质溶液加入适当的试剂，破坏它的水膜或中和它的电荷，就很容易使其失去稳定而发生沉淀。这种现象就叫做蛋白质的沉淀作用。**请注意，这里所说的沉淀作用不是指蛋白质变性后的沉淀作用。**因为这里所说的沉淀作用不影响蛋白质的空间结构，所得到的蛋白质具有生物活性，而变性后的沉淀则涉及空间结构的解体 and 生物活性的丧失。

在了解了蛋白质胶体的稳定因素和蛋白质沉淀的原因之后，就可以为在生物化学上制备有活性的蛋白质制品寻找有效的方法。

(1) 盐析法

盐析法是分离制备蛋白质制品常用的方法。其主要原理是利用中性盐破坏蛋白质的胶体性质，即夺取蛋白质胶体的水膜，使其容易相互聚集而沉淀析出。

当球状蛋白质水溶液加入中性盐之后，可产生两种现象，即盐溶现象和盐析现象。

盐溶现象：在盐浓度很稀的范围内，随着盐浓度的增加，环状蛋白质的溶解度亦随之增高。这种现象称为盐溶（Salting-in）。任何物质的溶解度都取决于溶质分子间的相对亲和力及溶质分子对溶剂分子的相对亲和。任何能降低溶质分子相互作用或能增高溶质分子和溶剂分子相互作用的因素都有助于增高溶解度。在稀盐溶液的情况下，蛋白质表面的带电基团吸附盐离子。由于盐的水合能力比蛋白质强，吸附盐离子后加强了蛋白质与水分子的相互作

用, 因而使蛋白质的溶解度增高 (图3—59)。

盐析现象: 随着盐浓度继续升高, 例如达到饱和或半饱和的程度, 蛋白质的溶解度逐渐变小 (图3—59), 蛋白质分子相互聚集而发生沉淀。这种现象叫做盐析 (Salting-out)。

盐析的机制是复杂的。一般认为盐析作用主要是由于大量中性盐的加入, 中性盐与水的亲和力大, 它不仅结合溶液中的自由水分子, 降低水的活度, 而且另一方面与蛋白质争夺水分子, 破坏蛋白质颗粒表面的水膜, 从而降低了蛋白质极性基团与水分子之间促进溶解的相互作用, 加大了蛋白质颗粒之间的相互作用。正是由于上述作用, 使得蛋白质从溶液中沉淀析出。

需要指出的是, 同样浓度的两价离子的中性盐, 对蛋白质溶解度的影响效果要比一价离子的中性盐大得多 (图3—59)。因为中性盐影响蛋白质溶解度的能力是它们离子强度的函数。离子强度可由离子的克分子浓度及其所带电荷按下式计算:

$$\text{离子强度}(\mu) = \frac{1}{2} \sum mZ^2$$

式中的 m 为各种离子的克分子浓度; Z 为各种离子的电荷; Σ 为连加符号, 表示各种离子的 mZ^2 的加和。例如 2 mol/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的离子强度为 $1/2(2 \times 2 \times 1^2 + 2 \times 2^2) = 6$; 而 2 mol/L 的氯化钠 (NaCl) 的离子强度为 $1/2(2 \times 1^2 + 2 \times 1^2) = 2$ 。

用于蛋白质盐析的中性盐以硫酸铵 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 最好。硫酸铵具有盐析能力强, 溶解度高, 溶解温度系数低 (0℃时为706克/升, 25℃时为766克/升), 不产生副作用等优点。盐析时, 先将蛋白质溶液的 pH 调至等电点附近, 此时因它的溶解度达到最低, 可以达到最佳盐析效果; 然后加入固体硫酸铵 (或饱和水溶液), 达到一定浓度后, 蛋白质即可从溶液中沉淀析出。再通过离心或者过滤即可得到该蛋白质的制品。

盐析法得到的蛋白质需要作进一步处理以除去盐类或其他小分子物质。先将蛋白质溶解, 然后装入透析袋中对水透析, 以除去盐类或其他小分子物质。蛋白质是大分子, 不能透过半透膜 (图3—60)。透析袋是用玻璃纸 (赛璐玢) 或火棉纸 (赛璐路) 等材料做成的半透膜。透析法也是纯化蛋白质的一种方法。在透析过程中有时会看到蛋白质沉淀析出的现象。这是因为在对水或很低离子强度的缓冲液透析时, 除去了蛋白质颗粒表面吸附的盐离子, 增大了蛋白质颗粒之间相互作用力, 引起蛋白质分子的相互聚集而沉淀下来。

各种蛋白质的氨基酸组成、大小都不相同, 分子颗粒表面极性基团的数目不同, 所含结合水的多少也不相同, 在浓盐溶液中的溶解度也必然不同。因此, 可以用不同浓度的中性盐

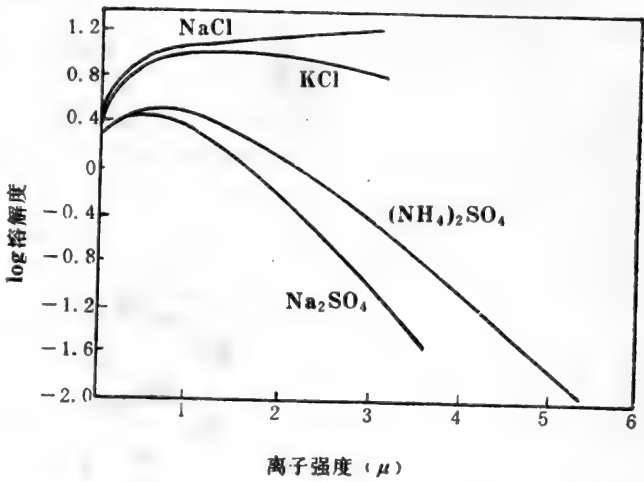


图3—59 马血红蛋白在不同离子强度盐溶液中的溶解度。
该蛋白质的盐溶和盐析现象很容易观察出。

使一混合蛋白质从溶液中分别沉淀下来，达到分离纯化的目的。这种方法叫做分级盐析。

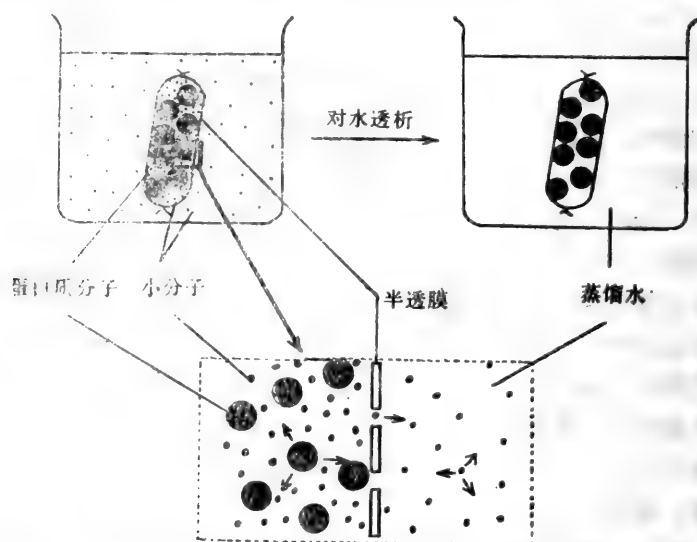


图3—60 透析。半透膜允许水、无机盐、葡萄糖等小分子物质自由穿过，但不允许象蛋白质这样的大分子穿过。

(2) 有机溶剂法

用来使蛋白质沉淀的有机溶剂主要是那些能与水混溶的中性有机溶剂，例如乙醇、丙酮等。它们的介电常数比水小，而且与水的亲和力也大，能以任意比与水相溶。当向蛋白质水溶液加入适量的这类有机溶剂时，就降低了水的介电常数，增强了蛋白质颗粒间的静电相互作用，削弱了蛋白质分子与水分子之间促进溶解的作用，导致蛋白质分子聚集而沉淀。同时，这类有机溶剂与水的亲和力大，能夺取蛋白质颗粒表面的一层水膜，因而起到了脱水剂的作用。失去水膜的蛋白质颗粒容易聚集而析出。上述两方面的原因，就是用有机溶剂沉淀分离蛋白质的理论依据。由于有机溶剂往往能使蛋白质变性失活，所以在用有机溶剂分离蛋白质时，宜用较稀浓度的有机溶剂，并在低温下操作。加入有机溶剂时，要搅拌均匀，以防局部过浓而引起变性失活。用有机溶剂法制得的蛋白质不宜在有机溶剂中放置过久，应立即加水溶解。

三、蛋白质的沉降作用及超离心分离

当把一杯蛋白质水溶液放置时，蛋白质颗粒不会因重力的作用而下沉。因为对于蛋白质胶体溶液来说，蛋白质颗粒相对太小、太轻，沉降的趋势被介质分子的热运动和溶液的热梯度产生的对流所克服。因此，重力作用不会使蛋白质沉降下来。如果采用超离心的方法，蛋白质分子就会在溶液中受到强大的离心力作用，克服对流的影响而沉降下来。这就是蛋白质的沉降作用 (sedimentation)。沉降的速度与蛋白质分子的大小和密度有关。

利用蛋白质的沉降特性，采用超速离心的方法可以分离纯化蛋白质或对蛋白质进行分析

鉴定。目前常用两类超速离心法，即沉降速度法和沉降平衡法。为了稳定不同分子量组分沉降所形成的区带，并阻止沉降更快的组分在较轻的组分被分开之前到达管底，防止离心过程中的机械振动、温度差别以及对流等的干扰，可用密度梯度来消除或者减轻这种干扰。密度梯度是由在离心管中能迅速扩散的物质如蔗糖、甘油、氯化铯等形成。管中溶液的密度由管底到管顶逐渐降低，形成一个平滑的梯度。

1. 沉降速度法

沉降速度法主要是根据各种被分离物质的沉降系数的不同来达到分离的目的。在离心时，蛋白质分子在单位时间 t （以秒计）内下沉的距离 x （以厘米计）称为沉降速度（sedimentation velocity），以 v 表示， $v = dx/dt$ 。当溶液中所含蛋白质颗粒大小和形状都相同时，这些颗粒以相同的速度移向管底，并形成清楚的界面。当溶液中含有多种大小不同的颗粒时，就会有几个界面，用特殊的光学系统可以观察到沉降界面，从而判断出蛋白质的沉降速度。

当沉降界面以恒定的速度移动时，单位离心场里的沉降速度称为沉降常数或沉降系数（sedimentation coefficient），以 S 表示。沉降系数表示沉降分子的大小特征，可从沉降速度求出：

$$S = \frac{v}{\omega^2 x} = \frac{dx/dt}{\omega^2 x}$$

式中： v 为沉降速度（ dx/dt ），可由实验测得；

ω 为离心机转子的角速度，以弧度/秒计（即 2π 乘转子每秒钟的转数）；

x 为蛋白质界面中点到转子中心之间的距离（以厘米计）。

一个 S (Svedberg) 单位为 1×10^{-13} 秒，用外推法求得。蛋白质的沉降系数大约为 1×10^{-13} — 200×10^{-13} 秒，即 $1S$ — $200S$ 之间。

沉降速度法所用的密度梯度范围小，即梯度中的最大密度小于沉降样品的最小密度。此法适用于分离密度相似，但大小不同的物质。若要分离混合蛋白质样品，可将样品放在一个连续的液体密度梯度上，进行超速离心（即速度-区带离心），直到各种蛋白质按照各自的速度（主要取决于分子的大小）在梯度中沉降下来，呈现出分开的、不连续的区带（图 3—61）。蛋白质的区带可通过光学定位或者通过离心管底部穿一个针孔，小心吸出管内的内容物进行

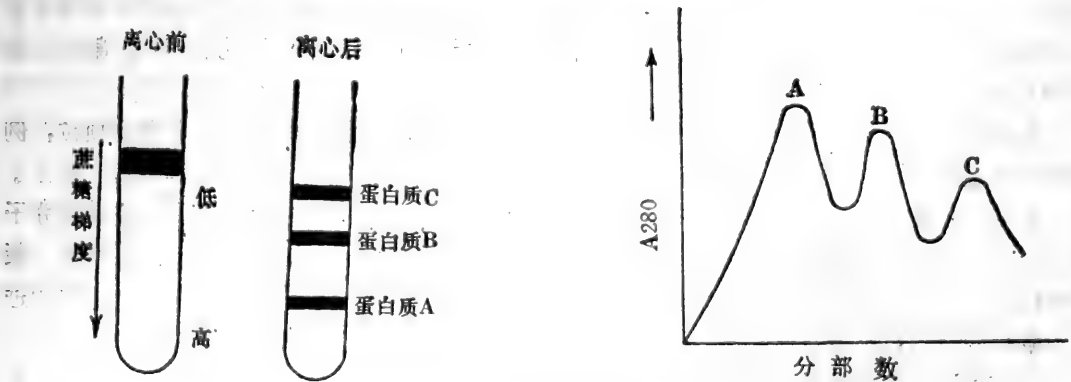


图3—61 沉降速度法分离纯化蛋白质

连续小样分析，即可得到不同组分的蛋白质或所需要的蛋白质。

2. 沉降平衡法 (Sedimentation equilibrium)

沉降平衡法是根据待分离物质的密度的不同来进行分离的。在这个方法中，所需要的密度范围大，即梯度的最大密度大于沉降样品的最大密度。此法适用于分离大小相近，但密度不同的物质。利用这种方法分离蛋白质时，首先在离心管中制造一个连续的密度梯度，然后将蛋白质样品加在离心管梯度的顶部。离心时，样品即在离心管中沿梯度移动，直到样品到达与它自身密度相同的密度部位为止，才不会继续沉降。若蛋白质样品含有几种不同密度的蛋白质，那么用此法就会使混合蛋白质分别漂浮于与它们各自相应的密度梯度中。因此，这个方法也叫做等密度离心法。

利用超速离心法不仅可以用来分离制备蛋白质、鉴定蛋白质的纯度，而且还可以用来测定蛋白质的分子量。如果已知有关蛋白质分子形状的参数（如扩散系数），就可以利用下面公式计算出某种蛋白质的分子量。

$$\text{分子量(MW)} = \frac{RT_s}{D(1 - \bar{v}_s \rho)}$$

式中，R 为气体常数 (8.314×10^7 尔格/克分子/度)；

T 为绝对温度；

D 为扩散系数 (厘米²/秒)，可以测定；

\bar{v} 为蛋白质微分比容 (即每克蛋白质的体积，以毫升计)；

ρ 为溶剂的密度；

S 为沉降系数。

四、蛋白质的凝胶过滤

从细胞中经过粗提取之后的蛋白质制品往往是不均一的。这种粗提取液含有某些性质上相似的一些杂蛋白。例如，它们的溶解性及带电状态可能相似，以致在用盐析法或等电点法分离时，它们与被分离的样品掺合在一起。但由于细胞内的各种蛋白质在组成和大小方面总是有差别的，因此，它们在性质上总是有可区分的地方，因而可利用这些差别将其分开。上述蛋白质的沉降特性及超离心分离，就是利用各种蛋白质在大小和密度方面的差别将混合蛋白质彼此分开。利用蛋白质大小不同这一特征，分离蛋白质的另外一种方法就是凝胶过滤 (Gel filtration) 或分子筛层析法。

所谓凝胶过滤就是利用高度水化的具有不同大小孔径的网状结构的惰性多聚物颗粒，例如葡聚糖凝胶 (Sephadex) 和琼脂糖凝胶 (Sephacrose) 等作为层析柱的填充物，把分子量大小不同的蛋白质混合物上样到层析柱上，混合物中的各组分便随着洗脱液的流动按分子量的大小以不同的速度向下移动。比凝胶孔径大的蛋白质分子不能进入网格内，被排阻在凝胶颗粒之外，它们流经柱床的路程短，首先被洗脱下来。比凝胶孔径小的蛋白质分子则能进入到凝胶网格内，不断从一个网格穿到另一个网格。这样因走“弯道”而移动速度变慢。分子愈小，弯道愈多，被洗脱流出的速度就更慢。于是，一个混合蛋白质样品就会按其分子量大小依先后顺序洗脱下来而被分离 (图 3—62)。所以，这种方法又称分子排阻层析法。

(molecular exclusion chromatography)。

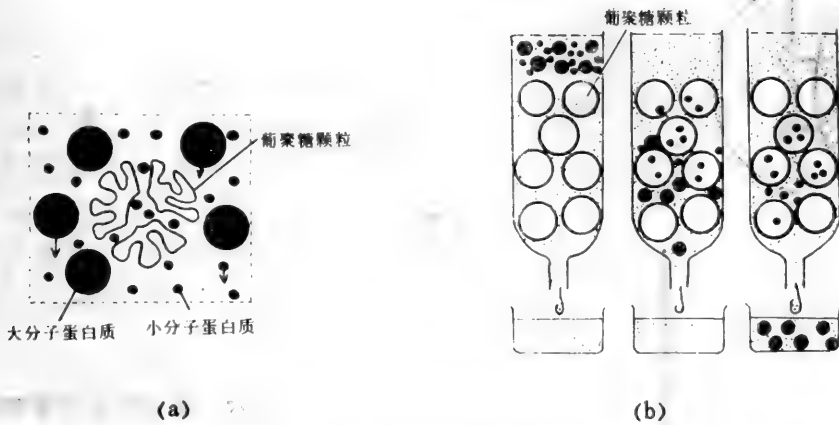


图3—62 蛋白质凝胶过滤分离
(a)为放大的凝胶颗粒；(b)大小不同的分子的洗脱顺序。

葡聚糖凝胶是由水溶性的葡聚糖（右旋糖苷）和交联剂环氧氯丙烷相互交联聚合而成的。交联剂愈多，孔径愈小。故可通过控制交联剂与葡聚糖的比例来制备各种规格的凝胶。这些不同规格的凝胶可用来分离各种不同的蛋白质、核酸、氨基酸和核苷酸等。也可以用来脱盐、浓缩等。

凝胶过滤不仅可以分离纯化蛋白质，而且也可以用来测定蛋白质的分子量。

五、蛋白质的配体特异性与亲和层析

蛋白质是有专一生物功能的物质，在行使功能的过程中常和某些特异性的分子结合，形成复合物。这种能和某种蛋白质结合的分子称为配体或配基（ligand）。例如酶和特异于它的辅酶、酶与它的专一性抑制剂、抗体和抗原、激素和受体等都具有这种性质。根据蛋白质配体特异性，建立了一种非常有效的方法——亲和层析法。

我们可以这样理解亲和层析：假如某种蛋白质 A ，在表现其功能的过程中需要和 B 物质结合，而且这种结合是专一的：



假如用化学的方法先将 B 物质与一种不溶性载体（ R ）偶联，得到 $R-B$ 。若偶联到 R 上的 B 不丧失与 A 结合的能力，那么将含有 A 的混合蛋白质通过装有 $R-B$ 的层析柱时， A 将与 B 结合，得到 $R-B \cdot A$ 。其他不能与 B 结合的杂蛋白将从柱下洗出。然后用适当的洗脱液可将 A 从层析柱上洗脱下来。

亲和层析的最大优点是只需一步就可以从一个非常复杂的混合物中分离出某种蛋白质或其他生物大分子，并获得高度纯化的制品。图3—63表示用亲和层析的方法分离刀豆球蛋白 A （concanavalin A ）。葡萄糖同刀豆球蛋白具有专一性的亲和力。将葡萄糖共价结合在不溶性载体上装柱。然后把含有刀豆球蛋白 A 的混合液通过此柱，刀豆球蛋白 A 便结合在柱上。用高浓度的葡萄糖溶液淋洗层析柱，即可把刀豆球蛋白 A 洗脱下来。

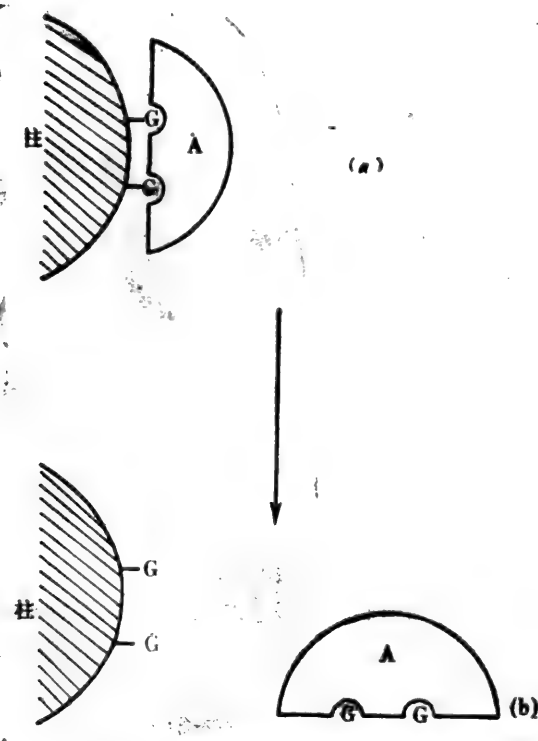


图3—63 亲和层析纯化刀豆球蛋白A

(a)表示刀豆球蛋白A与配体葡萄糖(G)专一性结合,

(b)用高浓度的葡萄糖洗脱。

上面结合蛋白质的有关性质简要地介绍了蛋白质分离纯化的几个基本方法。在获得无细胞提取液后,一般先用等电点法、盐析法或有机溶剂法获得粗提纯物。在此基础上可进一步采用离子交换法或凝胶过滤法使样品进一步纯化。根据需要也可用亲和层析、凝胶电泳、等点聚焦或超速离心的方法进一步纯化、分析或鉴定蛋白质。

六、蛋白质分子量的化学测定

在研究蛋白质结构时,常需要确定它的大小,即分子量。测定蛋白质分子量的方法很多,如上面提到的SDS-凝胶电泳、超速离心、凝胶过滤等都是测定蛋白质分子量的重要方法。这里我们补充说明蛋白质分子量的化学测定。

蛋白质分子量的化学测定是根据对蛋白质的某种氨基酸或某种特殊元

素的分析来计算的,其前提是假定该蛋白质1克分子只含有1克分子的某氨基酸或某元素。所以,这个方法测得的分子量是最小分子量。

例如,细胞色素c是一种含血红素辅基的蛋白质。根据分析,细胞色素c的铁元素的含量为0.43%,即100克细胞色素c含铁0.43克。但每分子的细胞色素c至少含有1个原子的铁元素。于是就有:

$$\frac{0.43 \text{ 克(铁)}}{100 \text{ 克细胞色素 c}} = \frac{\text{铁的原子量}(55.8)}{\text{细胞色素 c 的分子量}}$$

$$\text{细胞色素 c 的分子量} = \frac{55.8 \times 100}{0.43} \approx 13000$$

由于已知每分子的细胞色素c只含有一个铁原子,所以在这种情况下,上述分子量也是细胞色素c的真实分子量。

根据上面的计算,我们可以得出这样一个公式来计算蛋白质的最小分子量:

$$\text{最小分子量} = \frac{\text{组分的分子(或原子)量}}{\text{组分的百分含量}} \times 100$$

又比如,核糖核酸酶经酸完全水解,测得组氨酸的含量为4.2%。那么根据上面的公式,可以计算出该酶的最小分子量是:

$$\frac{155 \times 100}{4.3} = 3690$$

根据核糖核酸酶分子中的其他每种氨基酸的含量所计算出来的最小分子量在 900—7000 之间。这种差别是由于每种氨基酸在该酶分子中的含量（即氨基酸残基数）不同造成的。当知道了某种氨基酸的含量以及它的残基数，就可以计算出蛋白质的真实分子量：

蛋白质的真实分子量 = 最小分子量 × 某氨基酸的残基数。

核糖核酸酶分子结构中含有四个组氨酸残基。所以核糖核酸酶的真实分子量是 $3,690 \times 4 = 14,760$ ，与用其他方法测得的 14,000 的分子量很接近。

由于大多数氨基酸残基数值都偏高，所以很少用最小分子量来推算出真实分子量。相反，倒是常根据蛋白质的真实分子量和氨基酸的组成数来计算该蛋白质分子中的氨基酸残基数。蛋白质真实分子量可用前面已介绍的方法测定。

第六节 糖蛋白和脂蛋白

糖蛋白和脂蛋白都是生物学上的重要的蛋白质。在现代生物学和现代医学上引起了广泛的注意。这两类蛋白质在第一和第二章节曾提到过，下面仅就这两类蛋白质在组成及结构上作些补充介绍。

一、糖蛋白

糖蛋白(Glycoproteins)是一类由糖和蛋白质共价连接所成的复合大分子。糖与蛋白质之间的共价键是糖苷键，使用一般的方法不能把二者分开。这类蛋白质在生物界分布很广泛，所有动物、植物和细菌都含有糖蛋白。在不同的糖蛋白中，其糖基的含量是不相同的，差别很大。有的糖基部分只占整个糖蛋白的 1% 左右，有的却占 80% 左右。根据含糖量的多少可将糖蛋白分为两类。一类是含糖量高于 4% 的粘蛋白(mucoproteins)，另一类是含糖量低于 4% 的糖蛋白。狭义的糖蛋白是后者。糖蛋白的种类很多（表 3—7 和 3—8），分类也很不统一。这里仅择要介绍几种。

1. 糖蛋白的结构

组成糖蛋白的蛋白质部分与一般蛋白质相似，没有特别之处，只是某些氨基酸的含量较高，例如丝氨酸、苏氨酸、谷氨酸、天冬氨酸和天冬酰胺等。

参与糖蛋白组成的糖类，在动物体内常见的有 D-葡萄糖、D-半乳糖、D-甘露糖、L-岩藻糖、D-N-乙酰葡萄糖胺、D-N-乙酰半乳糖胺以及唾液酸等。糖蛋白中的糖主要是以吡喃环的形式出现。

在迄今所发现的糖蛋白中，糖链都是通过几种糖苷键中的一种以接枝的方式连接到肽链上的。尚未发现糖链和肽链以相间的方式共聚的糖蛋白。其原因是，糖蛋白的合成分为两步。第一步和普通蛋白质的生物合成一样，先合成蛋白质部分；第二步是，在一系列的糖基转移酶的作用下，将单糖单位按一定的顺序装配到肽链上的某些特定部位的氨基酸残基上。这一系列的糖基转移酶可能构成一个酶系。这第二步被称为翻译后的事件。

糖蛋白中的糖链和肽链的连接不是随意的，即是说糖链不是可以通过任何一种单糖连接到肽链中的任何一个氨基酸残基上。就目前所知，主要有下面几种连接方式：N-乙酰葡萄糖

表3-7 一些动物体液和分泌液中糖蛋白

来源	功能	糖蛋白
血 浆	运 输	转铁蛋白, 铜蓝蛋白, β -脂蛋白、甲状腺素结合蛋白、维生素 B ₁₂ 结合蛋白等
	蛋白酶抑制剂	α_1 -抗胰蛋白酶, α_2 -巨球蛋白等
	凝 血	血纤维蛋白原、凝血酶、多种凝血因子等
	免 疫	免疫球蛋白的 G、免疫球蛋白 M、补体 C _{1q} 等
乳 汁	运 输	乳转铁蛋白等
	营 养	K-酪蛋白等
唾 液	酶	α -淀粉酶等
垂 体	激 素	促甲状腺激素、促卵泡激素、促黄体生成激素
胰 汁	酶	核糖核酸酶、脱氧核糖核酸酶、脂肪酶
尿	激 素	绒毛膜促性腺激素
胃	酶	胃蛋白酶
	防 护	粘蛋白等
皮 肤	结 构	胶原等
软 骨	结 构	硫酸软骨素等
卵	营 养	卵白蛋白
	防 护	卵类粘蛋白

糖胺——天冬酰胺、N-乙酰半乳糖胺——丝氨酸或苏氨酸、半乳糖——羟赖氨酸等。例如大多数血浆糖蛋白、一些激素糖蛋白中糖链部分和肽链部分是通过 N-乙酰葡萄糖胺和天冬酰胺以糖苷键的形式相连的。

2. 糖蛋白的功能

(1) 粘蛋白

这是一类动物粘膜分泌的糖蛋白。它们的含糖量较高,而且唾液酸较多。这样使得粘蛋白具有特殊的性质。在正常生理条件下,唾液酸是带负电荷的,从而使粘蛋白表面的负电荷密度比较高。由于这些负电荷相互排斥,使整个分子伸展成棒状,结果粘蛋白溶液的粘度很大。机体内部和外界相接触的组织常常具有丰富的粘膜结构,就是凭借这些组织分泌的含有高浓度粘蛋白的粘液来保护动物机体的。用神经氨酸酶切去粘蛋白表面的唾液酸,粘蛋白的粘度明显下降,而且很内易被蛋白水解酶攻击。这充分说明粘蛋白的功能与表面的负电荷即

与唾液酸的存在密切相关。

(2) 体液糖蛋白

体液中含有多种糖蛋白，它们行使着多种多样的功能。血液中作为运输载体的甲状腺素结合蛋白、转铁蛋白、 β -脂蛋白等都是糖蛋白； α_1 -抗胰蛋白酶、 α_2 -巨球蛋白等蛋白水解酶的抑制剂也是糖蛋白；绒毛膜促性腺激素、促甲状腺素等则是糖蛋白激素；胰液中的激肽释放酶、牛胰核糖核酸酶 B、C、D 以及人腮腺分泌的 α_1 -淀粉酶等也都是糖蛋白；免疫球蛋白、补体 C_{1q} 也是糖蛋白。

很多糖蛋白的活性虽与糖无关，但糖在稳定蛋白质的天然构象中起一定的作用，有人认为糖链部分与糖蛋白的分泌有关。

(3) 膜糖蛋白

细胞膜的很多功能都和糖蛋白有关。细胞通过受体接受外来效应物的刺激，并将信息传递到细胞内，引起一系列的生物效应。细胞还能通过其表面特有的膜抗原向周围环境发出固有的信息，以表示它们的“社会”特性。细胞大体上就是用这两种方式和外界联系，进行通讯、识别的。这些受体和抗原有不少属于糖蛋白。细胞膜的另一个重要的功能是膜的通透性和物质的传送，很多与通透、传送有关的生物大分子也是糖蛋白。

(4) 糖蛋白结构与功能的关系

糖蛋白在生物体内担负着多种多样的功能（表3—7和3—8）。有的功能与蛋白质部分有关，有的功能则与糖有关。

表3—8 细胞膜表面的一些糖蛋白

来源	功能	糖蛋白
红细胞	血型物质	A, B, H 抗原, MN 抗原
	膜运输	Na ⁺ 、K ⁺ -ATP 酶等
	受体	MN 抗原（作为病毒和异源凝集素受体）
淋巴细胞	膜抗原	组织相容性抗原、Thy-1 抗原（T 细胞）等
	受体	抗体（作为抗原受体）、异源凝集素受体、胰岛素受体、补体受体
脂肪细胞	受体	胰岛素受体
肝细胞	受体	胰岛素受体、去唾液酸糖蛋白受体
间质细胞	受体	绒毛膜促性腺激素受体、促卵泡激素受体
甲状腺细胞	受体	促甲状腺激素受体
上皮细胞	受体	大肠杆菌受体

糖链部分的某些组分如唾液酸、糖醛酸、硫酸基等在生理条件下带负电荷，从而使得生

物大分子或细胞表面具有特殊的理化性质,例如上述粘蛋白中的糖链就起到了这种作用。由于糖链与肽链的结合,因而改变了生物大分子及细胞与水的相互作用,例如细胞表面的糖蛋白以及糖脂增加了细胞表面的亲水性,使细胞在机体内和大量存在的水能统一成为一个整体。糖链在生物体内最重要的作用在于识别和通讯,因此有人称糖链是细胞表面的化学天线,以此来形容糖链和细胞通讯、识别的关系。

二、脂蛋白

某些脂类能与特异性蛋白质结合成脂蛋白(Lipoproteins)。在脂蛋白中,脂类和蛋白质不是以共价键的方式结合的,它们之间主要靠一些次级键来维系。脂蛋白主要存在于血浆和生物膜中。因此,可将脂蛋白分为血浆脂蛋白和膜脂蛋白。

1. 血浆脂蛋白

血浆脂蛋白(Plasma lipoproteins)能通过血液在各组织之间运输不溶于水的脂类。人类的血浆脂蛋白可分为四种主要的类型,它们的组成、大小和密度均不相同(表2—4)。颗粒最大,但密度最小者是乳糜微粒(Chylomicron),它含脂类最多,蛋白质含量最少。颗粒最小,但密度最大者是高密度脂蛋白(High-density lipoproteins,简称HDL),它含脂类最少,而含蛋白质最高。其他两种是极低密度脂蛋白(Very-Low-density lipoproteins,简称VLDL)和低密度脂蛋白(Low-density lipoproteins,简称LDL)。

这类脂蛋白在结构上是相似的,大致具有如图3—64所示的结构,都有一个由中性三酰甘油或胆甾醇酯构成的核心,在这个核心的周围是一层蛋白质、磷脂和胆甾醇,其极性部分暴露在脂蛋白的表面。

当脂蛋白中的脂类脱去后,可得到蛋白质部分。脱去脂类的蛋白质就叫做脱辅基蛋白(apoprotein)或载脂蛋白。目前所知的脱辅基蛋白及其特性列于表3—9。

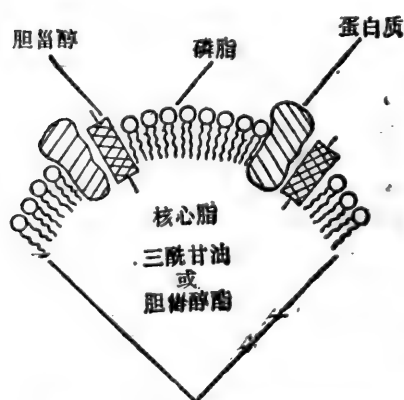


图3—64 人血浆脂蛋白的结构

乳糜微粒的主要作用是从肠内把三酰甘油和胆甾醇酯运送到其他组织中去。极低密度脂蛋白(VLDL)也以类似的方式把脂类从肝脏转运到其他组织中去。这两种富含三酰甘油的脂蛋白颗粒可被脂蛋白脂酶(Lipoprotein lipase)降解。脂蛋白脂酶是一种胞外酶,在许多组织(例如脂肪组织、心肌和骨骼肌、乳腺)的毛细血管内都很活跃。脂蛋白脂酶催化三酰甘油水解,产生脂肪酸和2-单酰甘油。脂蛋白脂酶可被脱辅基蛋白C—Ⅰ专一性激活,脱辅基蛋白C—Ⅰ是结合在乳糜微粒和极低密度脂蛋白中的。结果,脂蛋白脂酶就把由这两种血浆脂蛋白运来的三酰甘油水解成脂肪酸和2-单酰甘油。在心脏和脂肪组织中,脂肪酸可用来产生能量或作为三酰甘油的组分贮存起来。脂肪酸亦能在同白蛋白结合后转运到其他组织中去。

当这两类脂蛋白失去三酰甘油时则颗粒变小,某些表面分子(脱辅基蛋白、磷脂)被转移到高密度脂蛋白颗粒上。

低密度脂蛋白(LDL)的主要的功能是转运血浆胆甾醇及其酯类。每天人体大约45%的

表3—9 人体主要脂蛋白的脱辅基蛋白的特性

脱辅基蛋白	分子量	血浆中的浓度 (mg/100ml)	各种特性
A—I	28300	130	HDL 中的主要蛋白质(64%); 含245个氨基酸, 不含糖类, 能激活 LCAT*
A—II	17400	40	HDL 中的主要蛋白质(20%); 由两条相同的具77个氨基酸的肽链构成, 由残基6借二硫键相连接
B		80	LDL 中的主要蛋白质, 在去垢剂中很难溶解
C—I	7000	6	含57个氨基酸
C—II	10000	3	含80—85氨基酸; 激活脂蛋白脂酶
C—III	9300	12	含77个氨基酸以及 Gal, GalNAc, NeuNAc 等糖类
D	35000	10	作为胆甾醇酯的转运蛋白; 与HDL 和 LCAT 有关
E	35000	5	是一种富含精氨酸的脂蛋白

* LCAT 是卵磷脂:胆甾醇酰基转移酶

低密度脂蛋白从血浆中转移到肝脏和肝外组织中。体外实验表明, 人体皮肤成纤维细胞原生质膜上的专一性受体能与低密度脂蛋白结合, 并将低密度脂蛋白颗粒吞噬, 在与溶酶体融合后, 其可被溶酶体中的蛋白酶和溶酶体酸性脂酶作用而降解。胆甾醇及其衍生物从溶酶体扩散出去, 能抑制 β -羟基- β -甲基戊二酸单酰 CoA 还原酶的活性, 并激活酰基 CoA:胆甾醇酰基转移酶(ACAT)的活性。ACAT 能催化胆甾醇酯的合成, 合成的胆甾醇酯便贮存在细胞内。胆甾醇及其衍生物也能抑制低密度脂蛋白受体的合成, 因而限制了低密度脂蛋白的吸收。

高密度脂蛋白的主要作用是转移和消除胆甾醇及其酯类。当高密度脂蛋白从肝脏分泌进入到血浆时, 它几乎没有胆甾醇酯。这种“初生”的高密度脂蛋白颗粒因在它的内部积累胆甾醇酯而转变成球形颗粒。胆甾醇酯的形成是由卵磷脂:胆甾醇酰基转移酶(LCAT)催化的。该酶是一种糖蛋白, 分子量为59,000。LCAT 与高密度脂蛋白(HDL)结合, 并可被脱辅基蛋白 A—I 激活。另一种能与 LCAT-HDL 复合物结合的是脱辅基蛋白 D, 它是一种胆甾醇酯转移蛋白。目前认为胆甾醇酯在 HDL 中形成之后, 脱辅基蛋白 D 催化胆甾醇酯从 HDL 转移到 VLDL 或 LDL 中去。在稳态的情况下, 由 LCAT 催化合成的胆甾醇酯能被转移到其他脂蛋白上, 并进一步被分解。

血浆脂蛋白的异常, 反映出脂类代谢的改变。所以在临床上常通过测定血浆脂蛋白量的变化来辅助诊断某些疾病。

2. 膜脂蛋白

大多数膜约含有40%的脂类和60%的蛋白质。不同类型的膜，脂类与蛋白质的比例差异较大。每一种类型的膜含有几种或十几种蛋白质或多肽。膜脂蛋白可分为两类，一类是膜外周蛋白，仅与膜表面疏松地接触，可用温和的提取方法很容易提取出来；外一类是镶嵌在膜中的镶嵌蛋白，这类蛋白与脂类结合紧密，膜脂蛋白中的蛋白质大多属于糖蛋白类。膜脂蛋白中的脂类也不止一种，主要是磷脂，其次是糖脂。此外有的膜还含有胆固醇和三酰甘油。

膜的脂蛋白在膜的结构和功能中占据着十分重要的位置，是分子生物学的研究领域之一。

第四章 核 酸

第一节 核酸概述

1869年,瑞士青年科学家 F·Miescher 在研究细胞核的化学成分时,从脓细胞的核中发现了一种以前从不知道的含磷特别丰富的物质,当时,他称其为核素(nuclein)。后来通过分析,发现这种核素显酸性,于是就称为核酸(Nucleic acid)。核酸象蛋白质一样,是一种多聚体。构成核酸的单体是核苷酸。因此,核酸也被称为多聚核苷酸。

核酸可分为两种不同的类型,即脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic acid,简称DNA)和核糖核酸(Ribonucleic acid,简称RNA)。RNA根据其生物功能的不同又可分为信使核糖核酸(Messenger RNA,简称mRNA)、转移核糖核酸(Transfer RNA,简称tRNA)和核糖体核糖核酸(Ribosomal RNA,简称rRNA)。这两类核酸在所有植物和动物中都同时存在。在细菌中也存在这两类核酸。但是,DNA和RNA在细胞中的分布是有差别的。在真核细胞(Eucaryotic cell)内,DNA主要存在于细胞核染色体(Chromosome)中,称为染色体DNA;在其他细胞器内,如叶绿体、线粒体等也含有它们自身的DNA。在原核细胞(Procaryotic cell)内,因无细胞核,染色体DNA存在于细胞质中;在细菌细胞内还有一类分子较小的DNA,例如质粒(Plasmid)DNA等。RNA主要分布在细胞质中;在细胞核内也有存在,大部分集中在核仁(nucleolus)上。无论是DNA,还是RNA在细胞内都与蛋白质结合在一起,成为核蛋白体。

病毒是蛋白质和核酸组成的复合体。病毒所含核酸的类型因不同病毒而有别。就一种病毒而言,它要么只含有DNA,要么只含有RNA,不可能同时含有二者。所以,按所含核酸的类型,将病毒分为DNA病毒和RNA病毒。多数细菌病毒属于DNA病毒。大部分植物病毒为RNA病毒。在动物病毒中,有的属于DNA病毒,有的属于RNA病毒。

在核酸被发现后的75年间,核酸的研究进展十分缓慢,对它们在生物体内的作用一直认识不足。直到1944年,Avery及其同事通过有名的细菌转化实验,证明了DNA是一种遗传物质,DNA才重新开始被人们重视。这一发现虽然晚,但却为核酸的生物学研究开拓了新的领域。就RNA而言,它在细胞内的特殊的生物学作用直到本世纪五十年代后期才被确定。它在蛋白质生物合成中起着突出的作用。

1953年,Watson和Crick根据Chargaff等人所揭示的碱基组成规律,并结合DNA钠盐晶体X-射线衍射分析,提出了著名的DNA双螺旋结构模型,从而揭示了DNA分子作为一种遗传物质贮存和传递信息的化学机制。1958年,Meselson和Stahl用 ^{15}N 标记的大肠杆菌DNA首次证明了DNA的合成是采取半保留复制(Semiconservative replication)方式进行的,即新合成的DNA分子有一半是旧的,另一半是新的。这一工作为遗传信息的稳定和传递提供了强有力的证据,从而进一步证明了DNA双螺旋结构模型是正确的。

1960—1961年，在发现 DNA 指导的 RNA 聚合酶的基础上，Jacob 和 Monod 提出了转录 (Transcription) 的概念。细胞内的各类 RNA 都是以 DNA 为模板，在 RNA 聚合酶的催化下合成的。所以，RNA 是 DNA 转录的产物。同时，Jacob 和 Monod 还提出了原核基因 (Gene) 表达及调节控制的操纵子 (operon) 模型，为基因表达的调节控制提出了分子机制，为从分子水平上研究生物的分化和发育起了很大的推动作用。其后，经过将近十年的努力，搞清楚了 Crick 等人在五十年代后期提出的遗传信息怎样贮存在基因的核苷酸顺序中，以及信息如何被用来指令蛋白质多肽链的一级结构的假说。遗传密码的译解是本世纪最大的科学贡献之一，它把核酸与蛋白质之间的关系紧紧地联系在一起了。

七十年代初，H·Temin 和 B·Baltimore 各自单独证明了致癌的 RNA 病毒产生了一种反向转录酶 (Reverse transcripase)，它能利用单股 RNA 病毒基因组为模板合成 DNA，即 $\text{RNA} \rightarrow \text{DNA}$ 。反向转录酶 (即 RNA 指导的 DNA 聚合酶) 的发现，更加完善了 Crick 于五十年代后期提出的信息流向的中心法则 (Central dogma) (图4—1)。从图4—1我们可以看出，DNA 所携带的遗传信息通过自我复制，能够一代一代传下去。它又可以通过转录把遗传信息传给 RNA，然后以 RNA 为模板指导蛋白质的合成，从而表现出它的遗传性状。



图4—1 遗传信息的转移——中心法则。实线箭头表示在所有细胞中都普遍出现的转移，虚路箭头代表在某些 RNA 病毒感染的细胞中出现的转移。由于不存在任何蛋白质能自我复制并作为模板合成 DNA 或 RNA 的证据，因此，中心法则假定蛋白质的信息内容是不能转移的。

核酸结构与功能的研究，是分子生物学的主要内容之一，受到生物化学家和分子生物学家的高度重视。因此，核酸结构与功能的研究进展也是相当迅速的。七十年代以后，由于核限制内切酶的发现和 DNA 体外重组技术的兴起，核酸序列分析方法的突破，核酸人工合成的成功，极大地推动了核酸研究工作。在这期间，又揭露出分子生物学中的许多重大问题，例如基因重叠、插入序列、通读翻译、左旋 DNA 等等。这些问题看来都与基因表达的调节控制有着密切关系，其内容还有待进一步研究。核酸与蛋白质的相互作用也受到了相当大的重视。随着核酸的结构与功能的研究及其他分子生物学研究的不断进步，对大分子的结构与功能之间的关系必将会有更深入的认识。

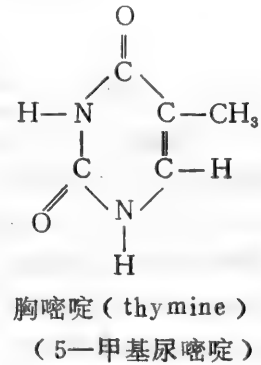
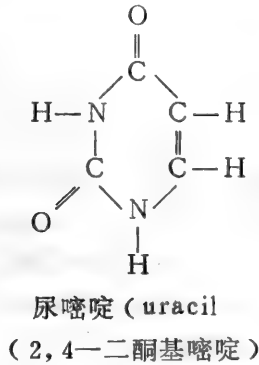
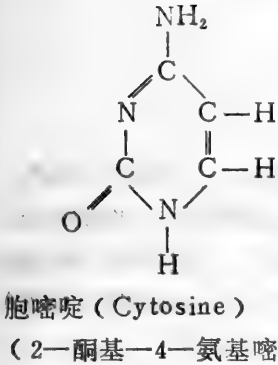
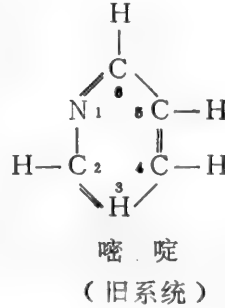
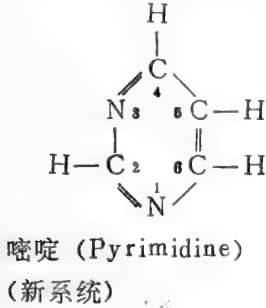
第二节 核酸的组成

核酸与蛋白质一样，是由许多基本单位构成的生物大分子。核酸的基本组成单位是核苷酸 (Nucleotide)，是由上百个乃至几千万个核苷酸缩合而成的多聚核苷酸 (Polynucleotide)。

一、核酸中的碱基

1. 嘧啶碱 (Pyrimidine bases)

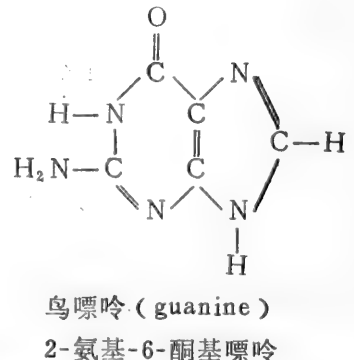
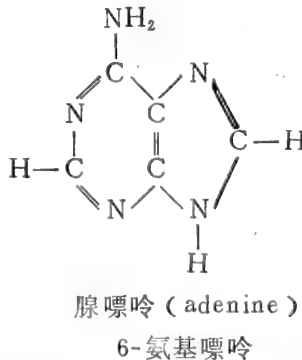
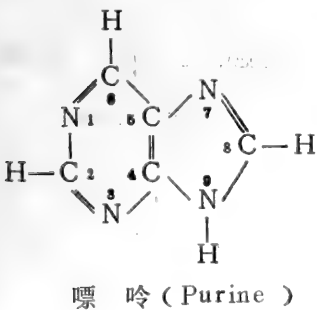
核酸中的嘧啶碱主要有三种，即胞嘧啶 (Cytosine)、尿嘧啶 (uracil) 和胸嘧啶 (thymine)。这些嘧啶碱都是嘧啶母本的衍生物。嘧啶碱环上原子的编号过去用旧系统，现在多按国际规定采用新系统，本书亦采用新系统编号。



胞嘧啶为 DNA 和 RNA 所共有，尿嘧啶只存在于 RNA 中；胸嘧啶一般只存在于 DNA 中，在 tRNA 中也少量存在。

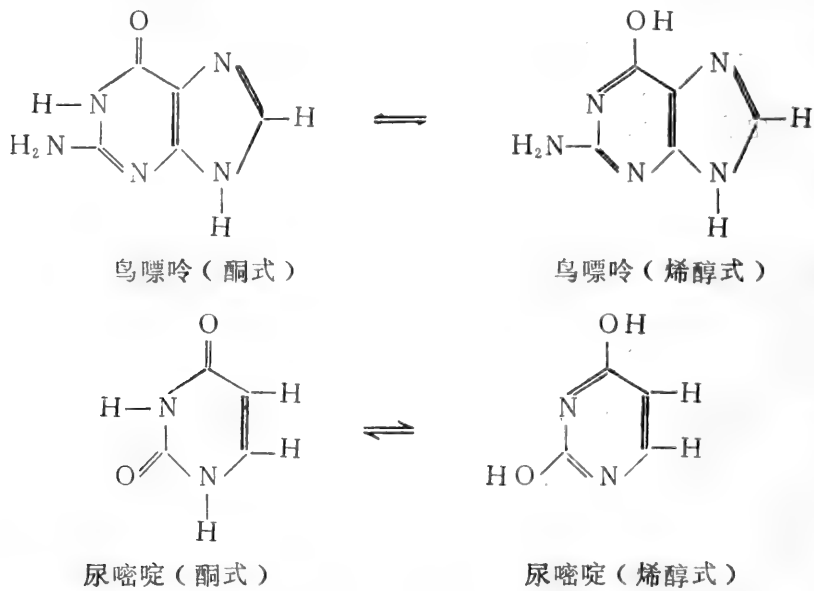
2. 嘌呤碱 (Purine bases)

核酸中的嘌呤碱主要有腺嘌呤和鸟嘌呤两种，它们都是嘌呤母本的衍生物。这两种碱基为 DNA 和 RNA 所共有



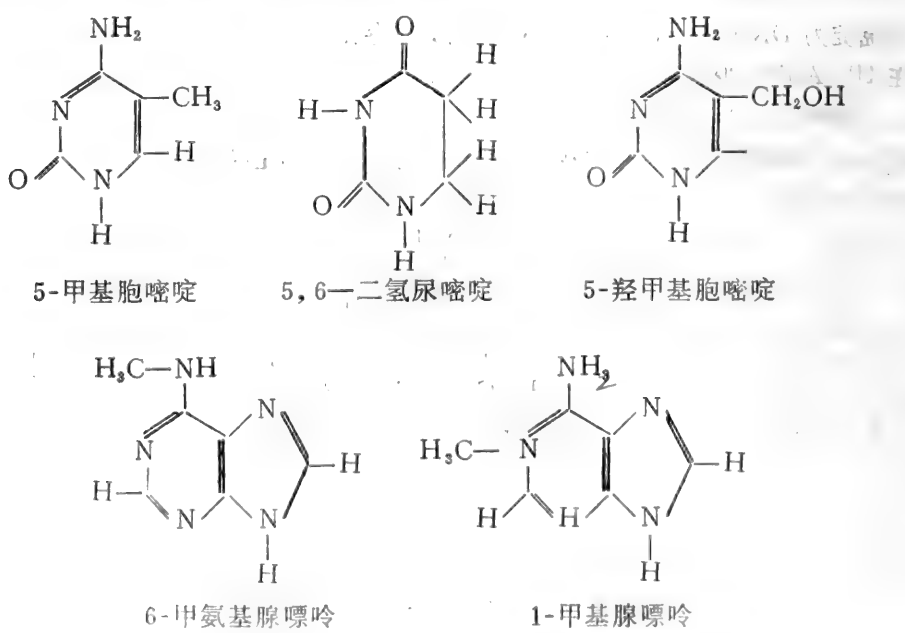
含有酮基的嘌呤碱或嘧啶碱在溶液中可以发生酮式和烯醇式的互变异构现象。在细胞内，

一般是以较为稳定的酮式存在。这对于核酸分子中氢键的形成是非常重要的。但是，如果发生互变异构，就会产生碱基替换作用，引起 DNA 分子的突变。



3. 稀有碱基 (Minor bases)

在核酸中，除上述五种主要的碱基外，还存在多种含量很少的碱基，称为“稀有碱基”。核酸中的稀有碱基大都是甲基化的碱基，它们都是在核酸生物合成之后经过甲基化酶修饰而成的。tRNA 含有的稀有碱基约占 tRNA 碱基总量的 5 %。有一些比较常见的稀有碱基如植物 DNA 中含有 5- 甲基胞嘧啶；大肠杆菌噬菌体(Phage)中含有 5- 羟甲基胞嘧啶，tRNA 中含有 5, 6-二氢尿嘧啶和 6- 甲基腺嘌呤等。



在酵母苯丙氨酸 tRNA 中发现一种极为少见的稀有碱基，叫做 Wye 碱基 (yt)，它具有如下结构：

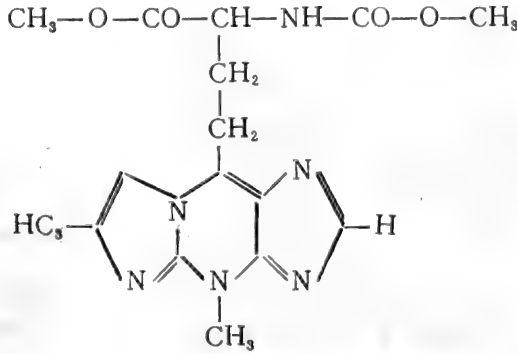
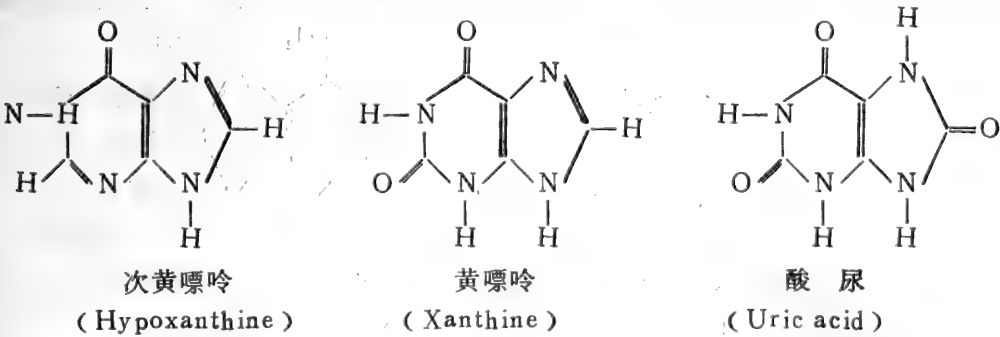


表4-1 RNA 中的某些重要的稀有碱基

1-甲基腺嘌呤	5-甲基-2-硫尿嘧啶
2-甲基腺嘌呤	3-甲基胞嘧啶
6-甲基腺嘌呤	4-甲基胞嘧啶
6,6二甲基腺嘌呤	二氢尿嘧啶
6-异戊烯基腺嘌呤	5-羟基尿嘧啶
6-羟甲基丁烯基腺嘌呤	5-羟甲基尿嘧啶
1-甲基鸟嘌呤	2-硫尿嘧啶
2-甲基鸟嘌呤	5-甲基胞嘧啶
2,2一二甲鸟嘌呤	5-羟甲基胞嘧啶
7-甲基鸟嘌呤	2-硫胞嘧啶
2,2,7-三甲鸟嘌呤	4-乙酰基胞嘧啶
次黄嘌呤	6-氨基酰基腺嘌呤
1-甲基次黄嘌呤	
黄嘌呤	

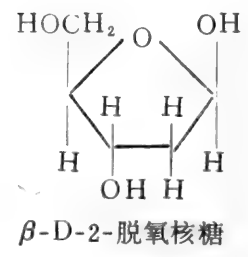
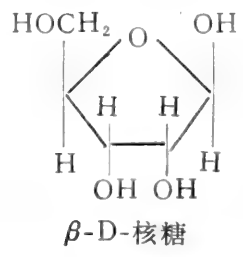
此外，在细胞内还有一些正常出现的嘌呤衍生物，包括次黄嘌呤、黄嘌呤和尿酸：



二、核苷 (Nucleoside)

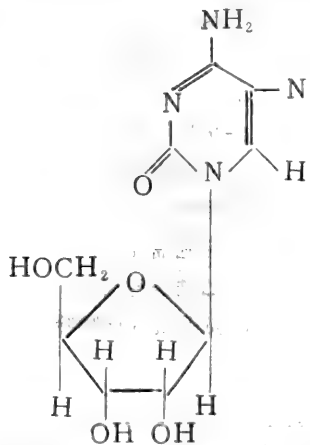
核酸是一种糖苷，由戊糖的苷羟基和碱基脱水缩合而成。核苷中的戊糖有两种类型。来

自 RNA 中的核苷，其戊糖组分是 β -D-核糖；来自 DNA 中的核苷，其戊糖组分是 β -D-2-脱氧核糖。

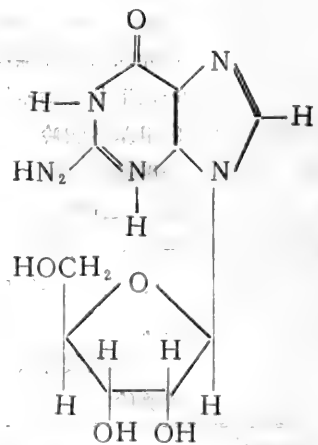


核苷中的糖苷键是 β -型的 C—N 键。在嘧啶核苷中，它由戊糖的苷羟基（C₁ 上的羟基）与嘧啶环的第 1 位的亚氨基脱水缩合而成；在腺嘌呤核苷中，由戊糖 C₁ 上的苷羟基和嘌呤环上第 9 位的亚氨基脱水缩合而成。

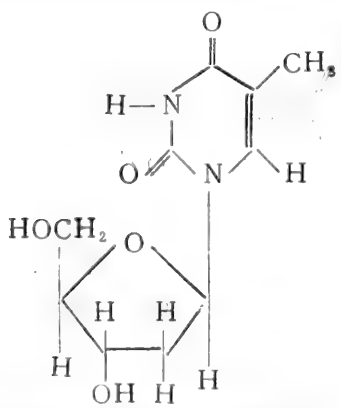
由于在 DNA 中含有脱氧核糖，在 RNA 中含有核糖，所以核苷有脱氧核糖核苷和核糖核苷之分。又由于碱基种类不同，故可将核苷分为嘧啶核苷和嘌呤核苷。表 4-2 列举了核酸中的主要核苷。X-射线衍射研究证明，核苷中的碱基垂直于糖环平面。



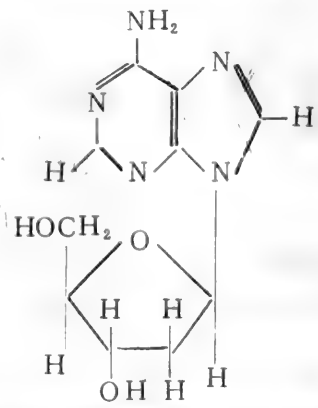
胞嘧啶核苷（简称胞苷）



鸟嘌呤核苷（简称鸟苷）



脱氧胸嘧啶核苷（简称脱氧胸苷）



脱氧腺嘌呤核苷（简称脱氧腺苷）

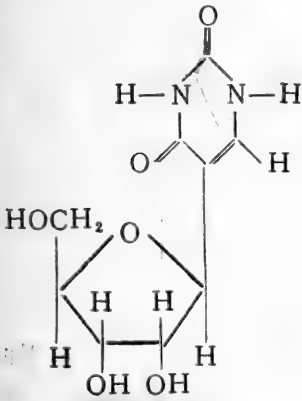
在某些种类的核酸中发现了一些稀有核苷。表4—3列举了在 RNA 中发现的几种稀有核

表4—2 DNA 和 RNA中的核苷

碱 基	脱氧核糖核苷	核 糖 核 苷
胞 嘧 啶	脱氧胞嘧啶核苷 (Deoxycytidine)	胞嘧啶核苷 (Cytidine)
尿 嘧 啶	——	尿嘧啶核苷 (Uridine)
胸 嘧 啶	脱氧胸嘧啶核苷 (Deoxythymidine)	——
腺 嘌 呤	脱氧腺嘌呤核苷 (Deoxyadenosine)	腺嘌呤核苷 (Adenosine)
鸟 嘌 呤	脱氧鸟嘌呤核苷 (Deoxyguanosine)	鸟嘌呤核苷 (Guanosine)

苷。在 tRNA 中有一种核苷，叫做假尿嘧啶核苷(ψ)(又称5- β -D-核糖苷尿嘧啶)，它的核糖是与尿嘧啶的第5位碳原子相连。这种 C—C 键比一般的 C—N 键稳定，不易被酸水放。

表 4—4 RNA 中的稀有核苷



1-核糖基胸嘧啶 (1-ribosylthymine)	2'-O-甲基尿嘧啶核苷 (2'-Omethyluridine)
5-核糖基尿嘧啶 (5-ribosyluracil)	2'-O-甲基胞嘧啶核苷 (2'-O-metnlycytidine)
2-核糖基鸟嘌呤 (2-ribosylguanine)	2'-O-甲基假尿嘧啶核苷 (2'-O-methylpseudouridine)
2'-O-甲基腺嘌呤核苷 (2'-O-methyladenoine)	2'-O-甲基-4-甲基胞嘧啶核苷 (2'-O-methyl-4-methlcytidine)
2'-O-甲基鸟嘌呤核苷 (2'-O-methylguanoine)	

假尿嘧啶核苷 (假尿苷)
(Pseudouridine)

三、核苷酸

核苷酸是由核苷和磷酸脱水缩合而成的，是核苷的磷酸酯。

1. 核酸中的核苷酸类别

和核苷一样，由于糖成分和碱基成分的不同，核苷酸也有各种不同的类别。含有核糖的称为核糖核苷酸 (Ribonucleotide)；含有脱氧核糖的称为脱氧核糖核苷酸 (Deoxyribo-nucleotide)。再根据碱基的不同，又可分别嘌呤核苷酸和嘧啶核苷酸。

用碱法或酶法水解 RNA 可以得到四种主要的核糖核苷酸，用酶法水解 DNA 也可以得到四种脱氧核糖核苷酸。这些核苷酸列于表4—4。

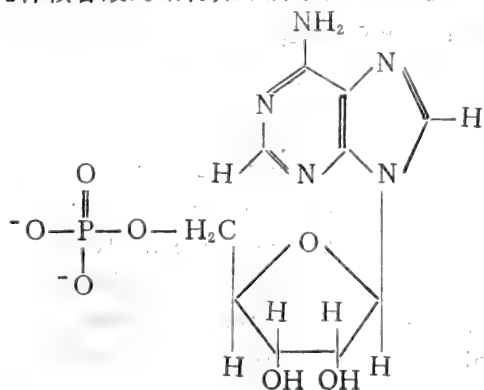
由于核糖核苷的糖环上有 2'、3'、5'三个自由的醇羟基，所以可以和磷酸形成三种不同的

表4—4 DNA 和 RNA 中的核苷酸

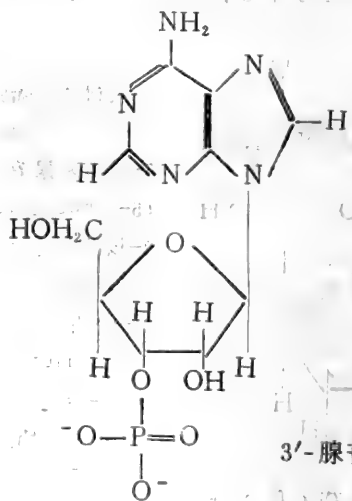
核酸	核 苷 酸	简称
RNA	腺嘌呤核苷酸(Adenosine monophosphate)	腺苷酸(AMP)
	鸟嘌呤核苷酸(Guanosine monophosphate)	鸟苷酸(GMP)
	胞嘧啶核苷酸(Cytidine monophosphate)	胞苷酸(CMP)
	尿嘧啶核苷酸(Uridine monophosphate)	尿苷酸(UMP)
DNA	脱氧腺嘌呤核苷酸(Deoxyadenosine monophosphate)	脱氧腺苷酸(dAMP)
	脱氧鸟嘌呤核苷酸(Deoxyguanosine monophosphate)	脱氧鸟苷酸(dGMP)
	脱氧胞嘧啶核苷酸(Deoxycytidine monophosphate)	脱氧胞苷酸(dCMP)
	脱氧胸嘧啶核苷酸(Deoxythymidine monophosphate)	脱氧胸苷酸(dTMP)

核苷酸，即2'—核苷酸、3'—核苷酸和5'—核苷酸。脱氧核糖核苷酸的糖环上只有3'和5'两个自由的醇羟基，因而只能形成3'—脱氧核苷酸和5'—脱氧核苷酸。生物体内游离存在的是5'—核苷酸。构成核酸大分子的核苷酸单位也是5'—核苷酸。

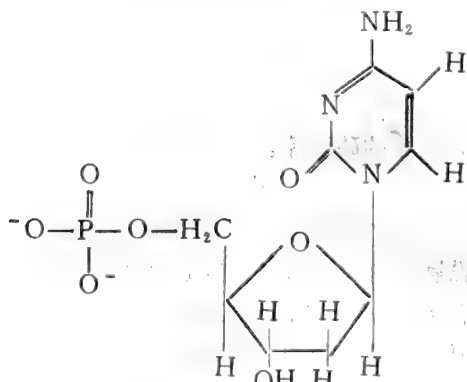
几种核苷酸的结构如下所示：



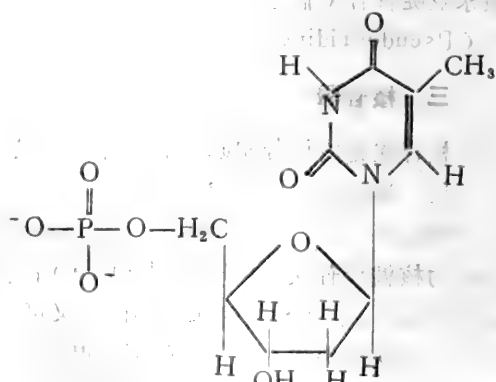
5'-腺苷酸(5'-AMP)



3'-腺苷酸



5'-脱氧胞苷酸
(5'-dCMP)

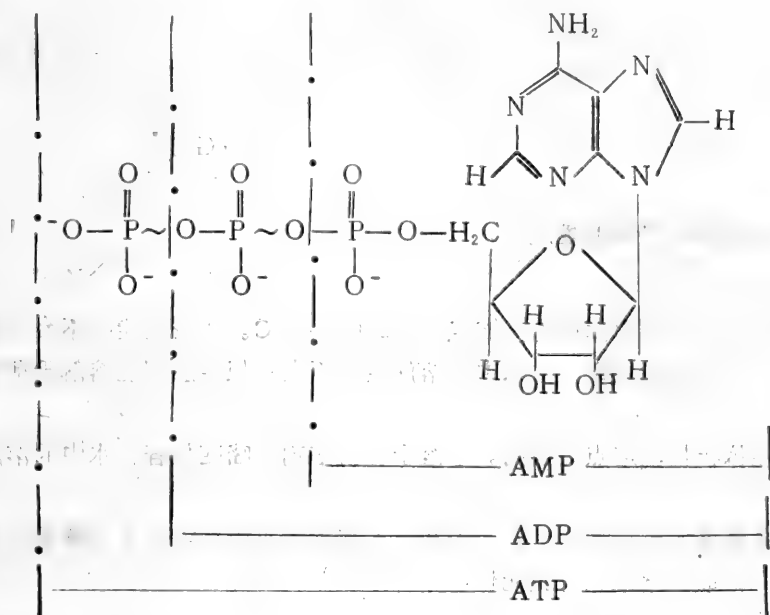


5'-脱氧胸苷酸
(5'-dTMP)

2. 细胞内游离的核苷酸及核苷酸衍生物

在细胞内，除了构成核酸的上述核苷酸外，还有一些核苷酸自由存在于细胞内，它们具有很重要的生理功能。

腺苷酸又叫做腺一磷（AMP），在细胞内它可以进一步磷酸化，形成腺嘌呤核苷二磷酸（简称腺二磷，用 ADP 表示）和 三磷酸（简称腺三磷，用 ATP 表示）。AMP、ADP 和 ATP 的结构关系可表示如下：

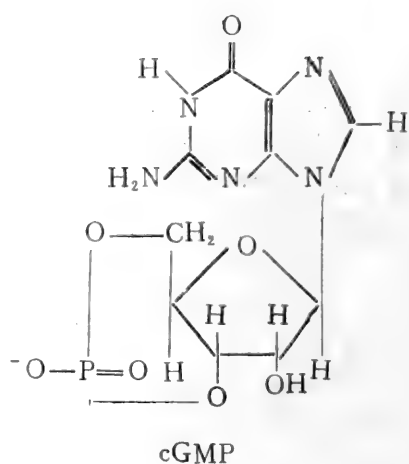
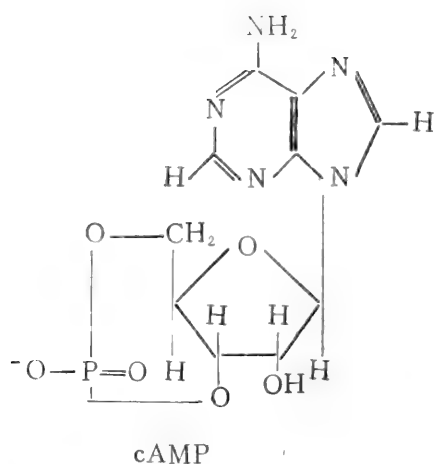


由于 ATP 和 ADP 特殊的分子结构而使得它们不稳定，末端磷酸基被水解时可以释放出很高的自由能，每克分子的 ATP 或 ADP 末端磷酸基被水解时，其标准自由能变化为 $-7,300$ 卡（见第八章）。ATP 是生物体内能量利用的主要物质，参与许多重要的生物化学反应（见代谢各章）。

生物体内除了 ADP 和 ATP 外，还有其他与此相类似的多磷酸核苷酸，如 GDP 和 GTP，CDP 和 CTP，UDP 和 UTP 等。它们在不同的合成代谢反应中，作为能量的供体。与上述核苷酸相对应的还有 dADP 和 dATP，dGDP 和 dGTP，dCDP 和 dCTP，以及 dTDP 和 dTTP。脱氧的或不脱氧的核苷三磷酸是生物细胞内合成核酸的原料。

生物体内还有一些重要的辅酶如烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD⁺）、黄素腺嘌呤二核苷酸（FAD）等，都是核苷酸的重要衍生物。在“维生素和辅酶”等章节中将予以介绍。

生物体内还存在环磷酸核苷酸，其中以 3',5'-环腺苷酸（简称环腺苷酸，以 cAMP 表示）和 3',5'-环鸟苷酸（简称环鸟苷酸，以 cGMP 表示）研究得较为详细。cAMP 作为激素作用的第二信使，在调节物质代谢过程中起十分重要的作用。cGMP 在细胞内的作用虽未肯定，但也受到普遍的注意。



四、碱基、核苷和核苷酸的性质

1. 一般物理性质

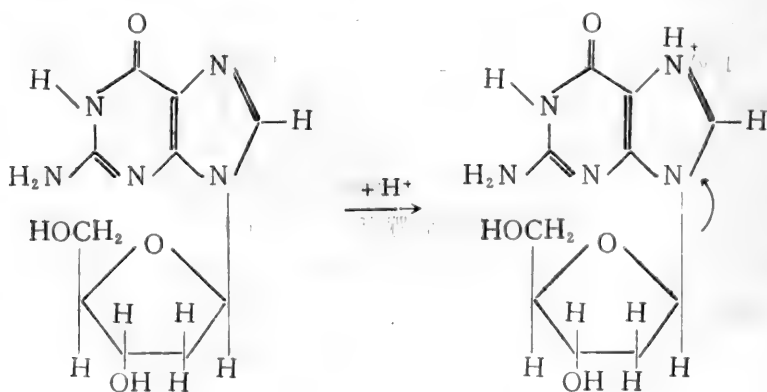
嘌呤碱和嘧啶碱为无色固体状物，熔点高达200—300℃。比较稳定，不会被稀酸或稀碱破坏。在有机溶剂中溶解度很小，在水中的溶解度也不大，但一般都能溶解于稀酸或稳碱溶液中。

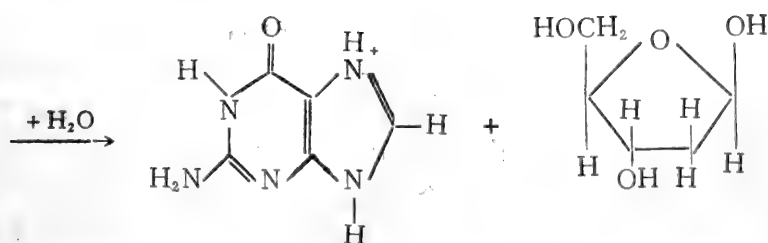
核苷为无色晶体状物，熔点也很高。不溶于有机溶剂。嘧啶核苷在水中的溶解度比嘌呤核苷大。

核苷酸为无色粉末状或结晶状，易溶于水，不溶于有机溶剂。由于核苷酸和核苷的核糖含有不对称碳原子，故其溶液具有旋光性。

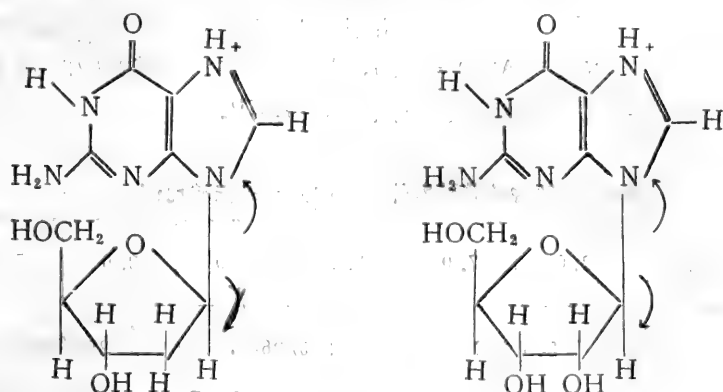
2. 核苷及核苷酸的水解反应

核苷和核苷酸中的糖苷键的水解一般在酸溶液中进行。脱氧核糖核苷比核糖核苷的糖苷键易于水解，嘌呤核苷又比嘧啶核苷更易水解。经研究鸟苷和腺苷证明，酸水解机制首先是嘌呤碱基质子化，然后 C—N 糖苷键断裂。水解机制可示如下：

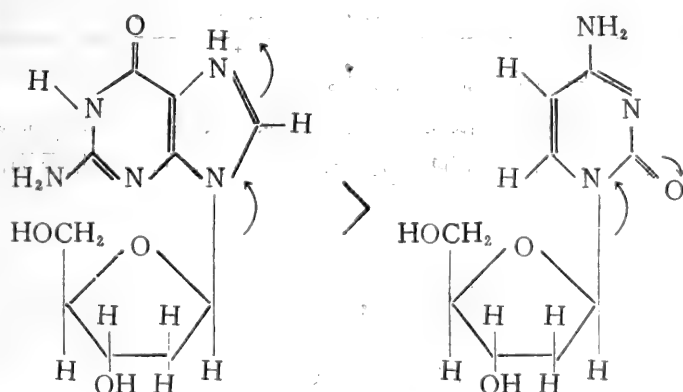




核糖核苷由于核糖 C_2 上的一OH 有一个拉电子的诱导效应。诱导电子效应与 C—N 糖苷键的断裂的效应相反，所以核糖核苷不及脱氧核糖核苷易于水解。其诱导效应可比较如下：



嘌呤核苷比嘧啶核苷易于水解。这是由于嘌呤环吸引电子的能力比嘧啶环强。



3. 紫外吸收特性

核苷和核苷酸的碱基具有共轭双键结构，故核苷和核苷酸在紫外光区具有强烈的吸收特性，其最大吸收在260毫微米(nm)处左右。由于碱基的紫外吸收光谱受碱基种类和解离状态的影响，故测定核苷及核苷酸的紫外吸收时应注意在一定的 pH 值下进行。利用碱基的紫外吸收的差别，可以鉴定各种核苷酸。

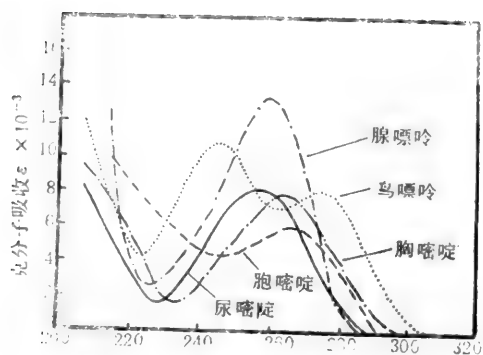


图4-2 嘌呤和嘧啶碱基在 pH7时的吸收曲线

(1) 核苷酸的鉴定

各种碱基、核苷或核苷酸都具有特定的紫外吸收曲线。图4—2表示各种碱基在 pH 7时的吸收曲线，表明它们的吸收峰并不完全重合。因此，当定性测定某一未知核苷酸时，可以分别在250、260、280和290nm处测定其消光值，再计算出相应的比值（250/260、280/260、290/260）。由于各种核苷酸都有特定的紫外吸收标准光密度（即消光值）比值（见表4—5），故可以将样品测定的比值与已知的标准比值比较，即可鉴定样品属于何种核苷酸。

例如在 pH 7测定某核苷酸溶液的 $A_{260} = 0.80$ ， $A_{280} = 0.121$ ；其 $280/260 = 0.121/0.80 = 0.15$ ，与标准比值相对照，就可以确定此核苷酸是5'-AMP。

表4-5 四种核苷酸紫外吸收的光谱的标准比值

核 苷 酸	PH					
	比值		2.0	7.0	2.0	7.0
			250/260		280/260	
5'-AMP	0.85	0.80	0.22	0.15	0.03	0.003
5'-GMP	1.22	1.15	0.68	0.68	0.40	0.28
5'-CMP	0.46	0.84	2.10	0.99	1.55	0.30
5'-UMP	0.74	0.73	0.38	0.40	0.03	0.03

(2) 核苷酸的定量分析——克分子消光系数法。

所谓克分子消光系数是指1克分子浓度的核苷酸溶液在某一波长的消光值。各种核苷酸的克分子消光系数列于表4—6。利用核苷酸的克分子消光系数，可以根据下面的公式计算出某溶液的核苷酸量：

$$E_{260} = \frac{A_{260}}{C \cdot L}$$

式中： E_{260} 代表某核苷酸在260nm处的克分子消光系数，

A_{260} 代表某核苷酸样品在同一波长下的消光值，

C代表某核苷酸样品的克分子浓度，

L代表比色杯内径，一般为1厘米。

例：某溶液含有5'-AMP，稀释10倍后，在 pH7，于260nm处测定光密度（即消光值）为0.5（O·D），求20ml原液中的5'-AMP的含量。

解：根据上面的公代

$$\begin{aligned}\text{核苷酸(毫克)} &= \frac{A_{260}}{E_{260}} \times M \times N \times V \\ &= \frac{0.50}{15.0 \times 10^3} \times 347.22 \times 10 \times 20 \\ &= 2.3 \text{ (毫克)}\end{aligned}$$

(上式中的 M 代表克分子量, N 代表稀释倍数, V 代表原液的体积)

表4-6 几种核苷酸的克分子消光系数和分子量

核苷酸	克分子消光系		分子量
	pH7	pH2	
5'-AMP	15.0×10^3	14.2×10^3	347.22
5'-GMP	11.4×10^3	11.8×10^3	363.24
5'-CMP	7.4×10^3	6.2×10^3	323.31
5'-UMP	10.0×10^3	10.0×10^3	324.18
ATP	15.4×10^3	14.3×10^3	506.81

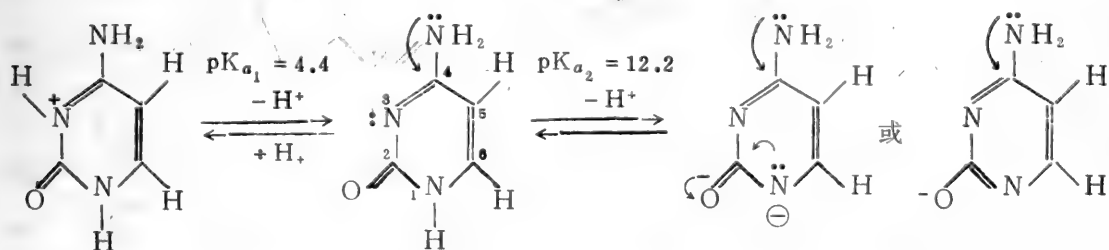
4. 碱基、核苷和核苷酸的解离

(1) 碱基的解离

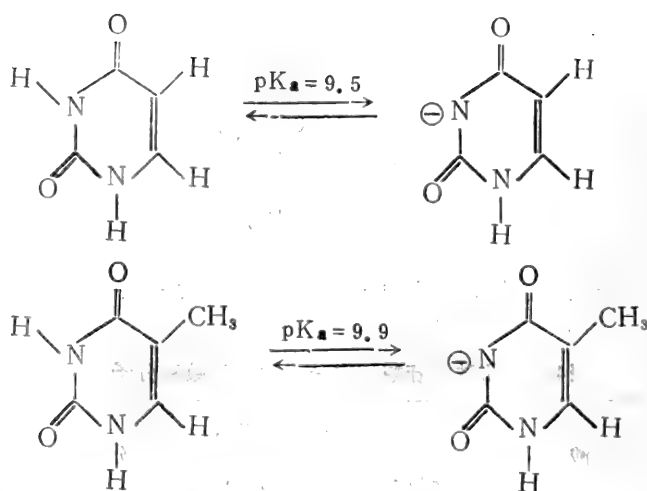
各种嘧啶碱和嘌呤碱杂环中的氮(N)杂原子以及一些取代基具有结合和释放质子的能力, 所以它们既具有碱性解离又具酸性解离的性质。胞嘧啶环上的 C₄ 位上的取代基氨基与杂环形成 p-π 共轭, 使相邻的 N₃ 上的电子密度增高, N₃ 上的未共用电子对易遭受质子化

($\text{—N=} \xrightarrow{\text{H}^+} \text{—NH=}$), 表现出碱的特性。胞嘧啶 N₁ 上的 >NH— 则由于与相邻

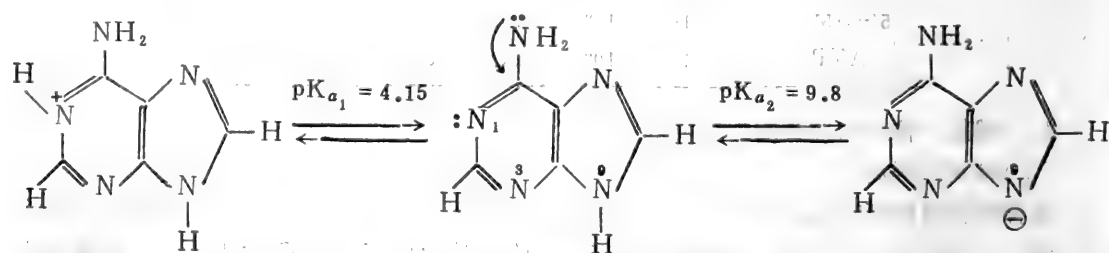
>C=O p-π 共轭, 并参与整个杂环共轭体系, 因此 N₁ 上的氢质子易于释放出来, 呈酸性解离。在水溶液中, 胞嘧啶呈现下列平衡解离现象。



尿嘧啶和胸嘧啶上无氨基, N₃ 或 N₁ 只能作酸性解离释放质子, 其理由与胞嘧啶 N₁ 的解离相同。



腺嘌呤的 N_1 可以接受质子，呈碱性解离，其理由与胞嘧啶 N_3 的解离相同，而 N_9 则呈酸性解离，这是由于 N_9 的未共用电子参与了杂环的共轭体系，其电子密度相对降低，所以 N_9 上的 H 可以解离。



鸟嘌呤 N_7 上的未共用电子可吸引一个质子而呈碱性解离。但 N_1 或 N_3 则由于 C_6 位上的酮基的影响，使其嘧啶环部分的电子密度降低，所以不能再接受质子。但鸟嘌呤 N_7 位接受质子的能力不及腺嘌呤的 N_1 强，因此，它的共轭酸的酸性较强，其 pK_{a1} 小于腺嘌呤的 pK_{a1} 。

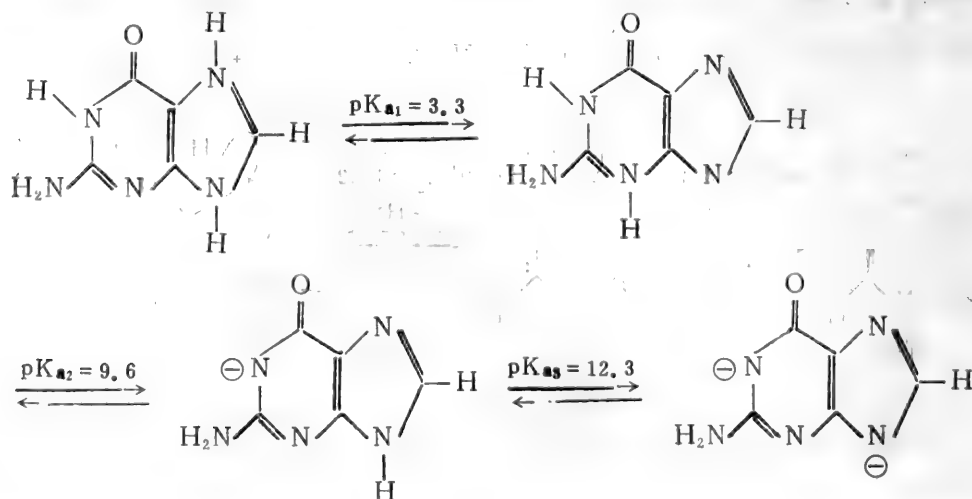


表4—7 四种主要核苷酸的可解离基团的 pKa 值

核 苷 酸	碱基环上—N $\xrightarrow{H^+}$ — 的 pKa 值	第一磷酸基 的 pKa 值	第二磷酸基 的 pKa 值	碱基环上烯醇 式羟基的 pKa 值
AMP	3.70	0.9	6.01	—
GMP	2.30	0.7	5.92	9.70
CMP	4.24	0.8	5.97	13.20
UMP	—	1.0	5.88	9.43

(2) 核苷的解离

核苷的碱基由于戊糖的存在，而影响各解离基团的解离。例如腺嘌呤核苷上的腺嘌呤解离的 pKa₁ 由 4.15 降到 3.63，胞嘧啶核苷上的胞嘧啶的 pKa₁ 由 4.4 降到 4.15。这说明戊糖上的羟基的诱导效应降低了碱基杂环上氮原子的电子密度，增强了它的酸性解离。

(3) 核苷酸的解离

核苷酸中碱基的解离与核苷相同，但额外多了磷酸基的两个解离基团，第一磷酸基和第二磷酸基。几种主要核苷酸的各解离基团的 pKa 值如表4—7所示。

图4—3是四种核苷酸在不同 pH 时的解离曲线。从图可以看出，第一磷酸基和碱基环上的 H₊—N= 的解离曲线交点的 pH 值是二者解离度刚好相等的 pH 值，即是说，在此 pH 值时，第一

磷酸基解离所带的负电荷数刚好与—N= 解离而带的正电荷数相等。在这个 pH 下，第二磷酸基尚未解离。所以，这个 pH 值应为该核苷酸的等电点，核苷酸此时以两性离子形式存在。当 pH

值小于该核苷酸的等电点时，第一磷酸基解离度降低，负电荷减少；而—N= 的解离度则得到加强，即正电荷增多。这时，整个核苷酸带正电荷。相反，如果 pH 大于该核苷酸的等电点，则—N= 上的 H⁺ 释放出来，正电荷数减少，而第一磷酸基的解离度增强，整个核苷酸就带负电荷。现以胞嘧啶核苷酸为例来说明上述的解离情况。

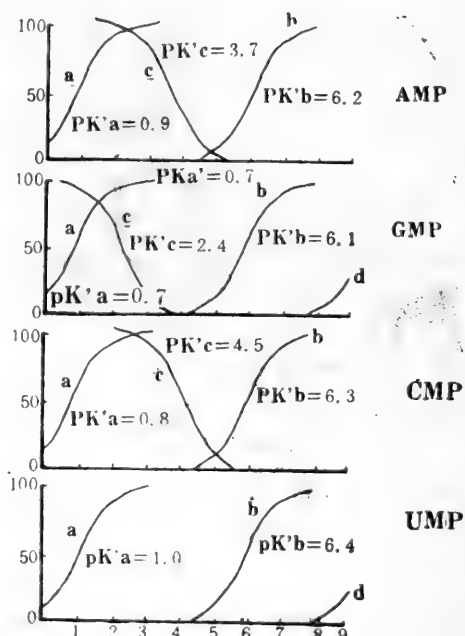
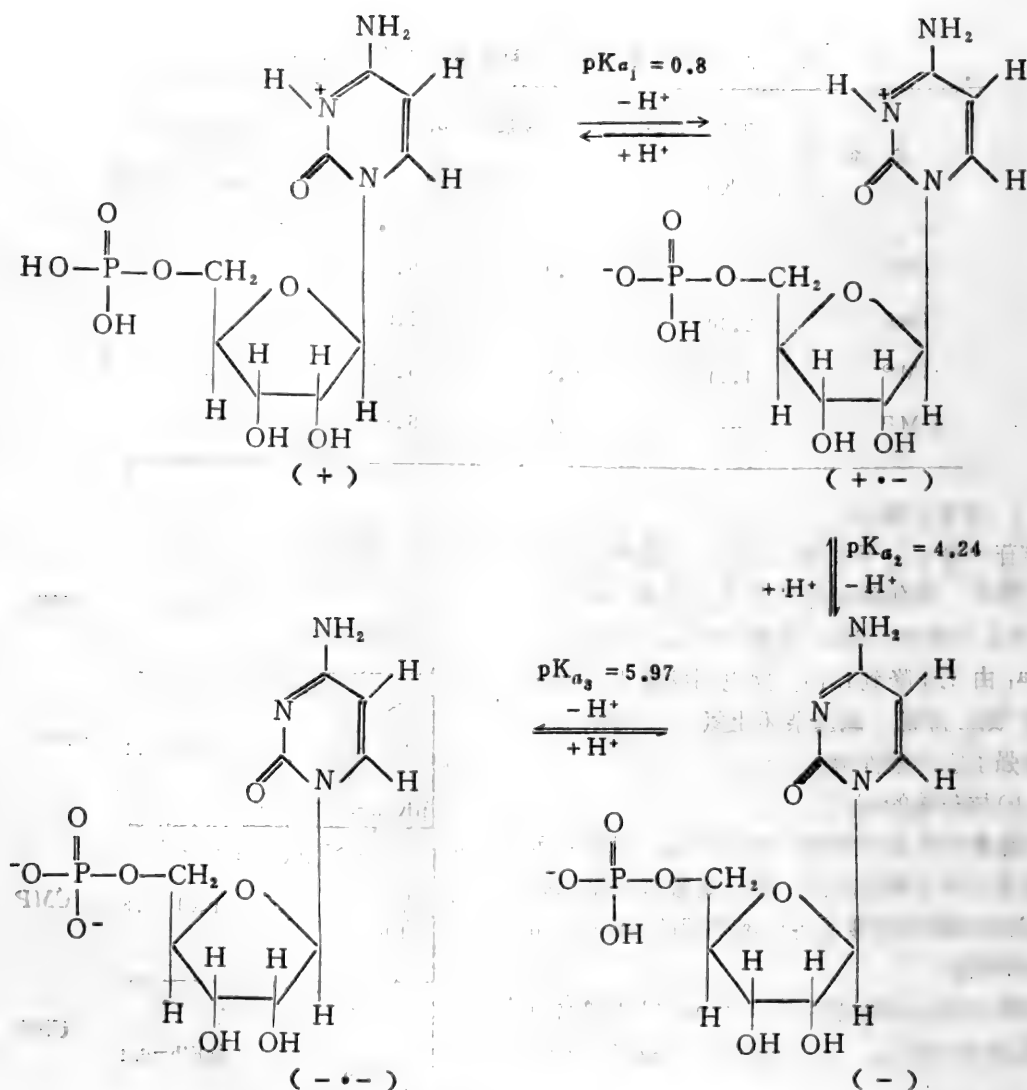


图4—3 核苷酸的解离曲线

a 为第一磷酸基的解离，b 为第二磷酸基的解离，c 为碱基环上—N= 的解离，d 为烯醇式羟基的解离。



研究核苷酸的解离特性对于分离提纯核苷酸 具有重要的意义。从它们的 解离曲线(图 4—3)和 pK_a 值(表4—7)来看,在 $pH 2.0—5.0$ 之间,所有核苷酸的第一磷酸基几乎完全解离,第二磷酸基几乎处于尚未解离的状态,而带正电荷的—N⁺—在此范围内的解离各不相同。在 $pH 3.5$ 时,第一磷酸基已完全解离,带 1 个单位的负电荷,第二磷酸基尚未解离,各核苷酸的—N⁺—解离度却有明显的差别,分别为 $CMP(+0.84) > AMP(+0.54) > GMP(+0.05) > UMP(0)$ 。各核苷酸的总净电荷分别为:

$$AMP \text{ 的总净电荷} = -1 + 0.54 = -0.46$$

$$GMP \text{ 的总净电荷} = -1 + 0.05 = -0.95$$

$$CMP \text{ 的总净电荷} = -1 + 0.84 = -0.16$$

UMP 的总净电荷 = $-1 + 0 = -1$

这样，所有核苷酸都带上负电荷，且带负电荷的多少各不相同，在 pH3.5 的缓冲液下进行电泳，它们便以不同的速度向正极移动，从而可以将它们完全分开。移动的速度是 $UMP > GMP > AMP > CMP$ 。

用离子交换树脂分离核苷酸时，也是利用它们在不同 pH 值下的解离程度的差别。当用阳离子交换树脂分离上述四种核苷酸时，先用低 pH 值（例如 pH 1）处理，使它们都带上正电荷（UMP 除外），结合在树脂上。然后用梯度缓冲液进行洗脱。随着缓冲液 pH 值的升高，核苷酸的正电荷数降低。依正电荷降低的速度不同而洗脱下来的顺序也不相同。UMP 因不带正电荷，首先被洗脱下来，接着是 GMP。第三个被洗脱下来的应是 AMP。最后洗下来的是 CMP。但是这两种核苷酸的洗脱顺序刚好相反。因为嘌呤环比嘧啶环同交换树脂的非极性吸附大三倍，抵消了它们之间的正电荷的差别，故实际洗脱顺序是：UMP → GMP → CMP → AMP。

第三节 核酸的共价结构

核酸是由核苷酸构成的生物大分子。虽然核酸不象蛋白质那样种类繁多，而且核酸的构成单位核苷酸也只有四种，不象蛋白质那样含有约 20 种氨基酸。但是为什么核酸能够指令编码各种蛋白质呢？对于这样的问题的回答必须有赖于对核酸结构的认识。

一、磷酸二酯键

核酸（DNA 和 RNA）是由核苷酸通过 3', 5'-磷酸二酯键（phosphodiester bond）连接而成的生物大分子。这个结论是经过一系列的实验得出来的。

根据核苷酸的组成和结构，核苷酸单位之间连接的方式有下列几种可能性。

① 一个核苷酸的磷酸基团与另一个核苷酸戊糖上的醇羟基脱水形成的酯键（即磷酸二酯键）。

② 一个核苷酸的磷酸基和另一个核苷酸碱基上的亚氨基形成磷酸酰胺键。

③ 一个核苷酸的磷酸基和另一个核苷酸碱基上的烯醇式羟基之间形成磷酸烯醇式酯键。

④ 核苷酸之间的戊糖以醚键相连。

⑤ 核苷酸之间磷酸基形成焦磷酸键。

但是，后来通过对小牛胸腺 DNA 的酸碱滴定曲线分析，很快得出了磷酸酯键是核酸中核苷酸的键合方式这样一个结论。

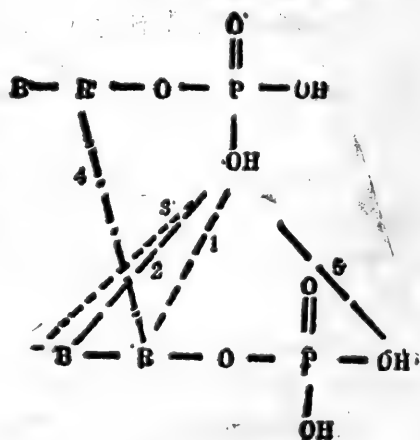


图4-4 核苷酸之间可能的键合方式
(序号见正文说明)

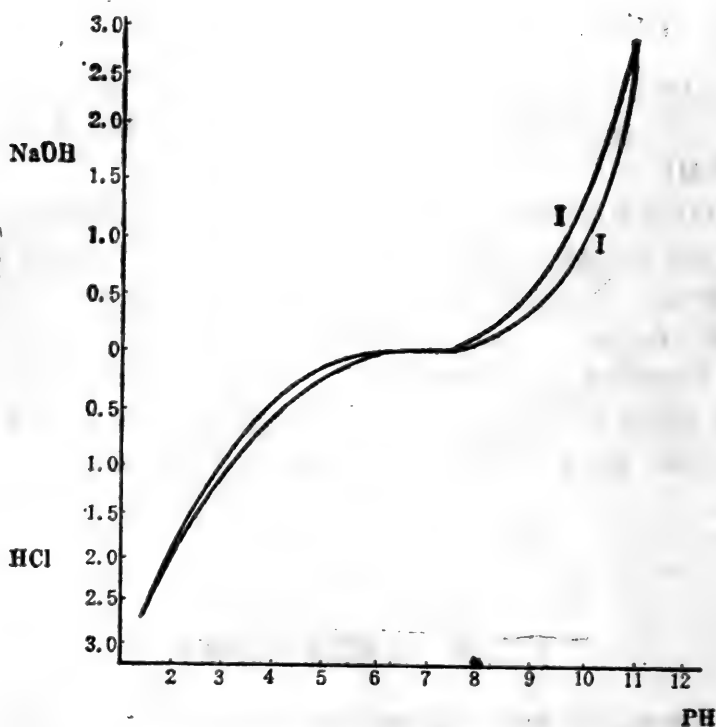


图4—5 小牛胸腺 DNA 的酸碱滴定曲线

图4—5是小牛胸腺 DNA 的酸碱滴定曲线。从该图可以看出，在 pH6—8 之间，只要稍加入一点酸或碱，pH 值立即发生很大的变化。表明在这个 pH 范围内 DNA 分子没有可滴定的基团与滴加的酸或碱作用，所以使溶液的 pH 值迅速改变。这个 pH 范围应是第二磷酸基的解离范围。这说明在 DNA 分子中没有第二磷酸基自由存在，而是处于结合状态。这表明磷酸酯键可能是核苷酸之间的连接键，同时也就排除了醚键的可能性。

在 pH6—2 之间，滴定时 pH 变化很慢，即存在“缓冲区”，表明有可滴定的基团存在。

这个 pH 范围是碱基上的 $\text{—N=} \xleftrightarrow{\text{H}^+} \text{—N=+H}^+$ 的解离范围。这说明 DNA 分子中的碱基上的 —N= 没有参与成键结合。这样就否定了磷酸酰胺键的可能性。

在 pH8—12 之间，滴定时 pH 变化也很慢，即是说也存在一个“缓冲区”，表明有可滴定的基团存在。这个 pH 范围应该是碱基上烯醇式羟基的解离范围。说明 DNA 分子中的鸟嘌呤和胸嘧啶的烯醇式羟基处于自由状态，没有参与成键。这样就否定了磷酸烯醇式酯键的可能性。

此外，核酸本身的酸性较强，其 pK_a 值约在 1 左右，表明核苷酸上的第一磷酸基没有被结合，焦磷酸键是不可能的。

由上述分析可见，磷酸二酯键是唯一可能的成键方式。

至于核苷酸之间的成键位置，可通过专一性的核酸酶对核酸的作用而证实。当用蛇毒磷酸二酯酶处理核酸时，得到的产物是四种核苷-5'-磷酸（即 5'-核苷酸）的混合物。这表明核苷酸之间的键与戊糖上的 C_5' 位置有关。当用牛脾磷酸二酯酶水解核酸时，产生核苷-3'-

磷酸(即 3'-核苷酸)。这表明核苷酸之间的键与戊糖上的 C_{3'} 位置有关。综合这两种酶作用的结果,就证明了核苷酸之间的连接键的位置是 3'→5', 核酸就是通过核苷酸之间的 3',5'-磷酸二酯键连接而成的大分子。

二、核酸共价结构的表示法

图4—6(a)和(c)是核酸一段共价结构的线型模式结构。如图所示,核酸是许多核苷酸的聚合物,因此,核酸的共价结构(即它的化学结构或一级结构)常称为多聚核苷酸。多聚核苷酸有两个末端,一端叫做 5'-端,另一端叫做 3'-端。

为了方便,通常将多聚核苷酸写成缩写形式。书写多聚核苷酸时一般从 5'-端到 3'-端。图4—6(b)和(d)是核酸共价结构的简化形式。“P”写在碱基的左边,表示“P”在 C_{5'} 位

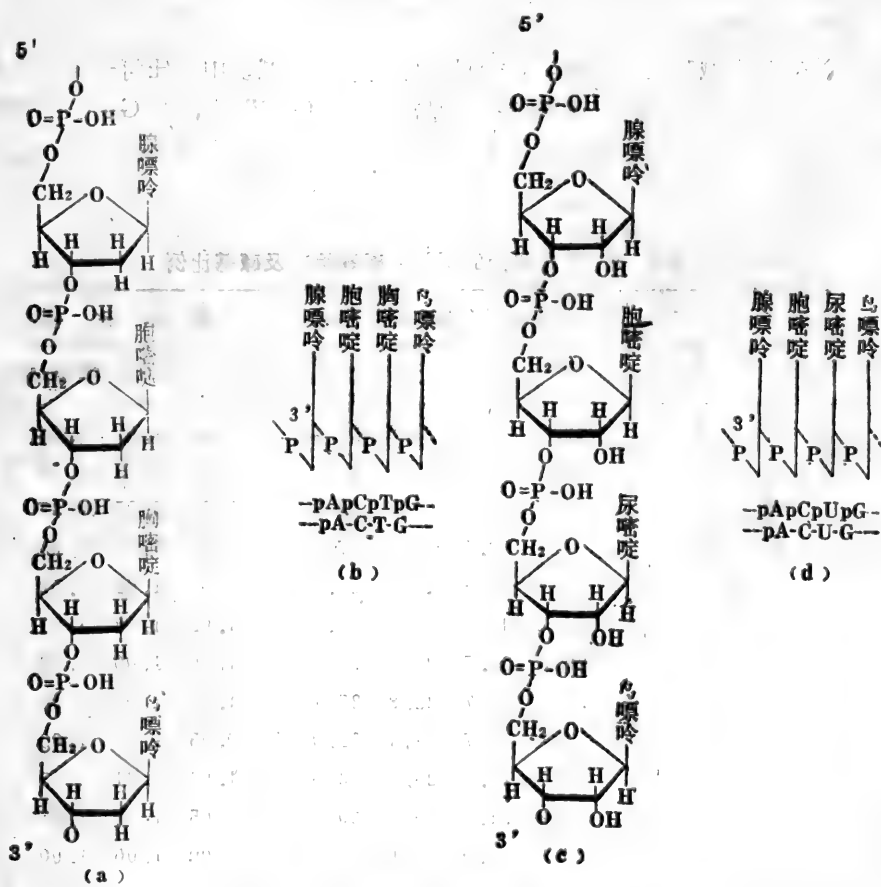


图4—6 核酸的共价结构及其表示
(a)和(b)代表 DNA 的多聚核苷酸链;
(c)和(d)代表 RNA 的多聚核苷酸链。

上,若“P”写在碱基的右边,则表示“P”在 C_{3'} 位上。若在 5'-端和 3'-端没有磷酸基团,也可以表示为 5'...ACTG...3'。这些不同的表达形式是强调分子的碱基顺序和内容。上述书

写方法对 DNA 和 RNA 都适用。

第四节 DNA 的结构

一、DNA 分子的碱基组成特征

DNA 分子是由两种脱氧嘧啶核苷酸 (dCMP 和 dTMP) 和两种脱氧嘌呤核苷酸(dAMP 和 dGMP)组成。Chargarff 等人用水解和层析的方法测定了不同来源的 DNA 分子的碱基组成，揭示了 DNA 分子组成的规律。这些规律是：

- ①嘌呤碱基(A 和 G)等于嘧啶碱基(C 和 T)，即 $(A+G) = (T+C)$ 。
- ②含氨基的碱基(A 和 C)等于含酮基的碱基(C 和 T)，即 $(A+C) = (G+T)$ 。
- ③腺嘌呤与胸嘧啶等量存在，鸟嘌呤与胞嘧啶等量存在，即 $A/T = G/C = 1$ 。这一点对于 DNA 双螺旋结构模型的提出有特别的意义。

根据 DNA 分子碱基组成规律，我们只要知道这四种碱基中的任何一种的含量，就可以推算出该 DNA 分子碱基之间的比例关系。通常引用 “G·C” 值，即 G+C 的百分含量来表示。例如，G·C 值为 40% 的 DNA 分子，就意味着该分子含 G 为 20%，C 为 20%，A 为 30%，T 为 30%。

表4—8 不同来源的 DNA 碱基组成及碱基比例

来 源	碱基相对含量(克分子%)				碱 基 比 例		
	A	G	C	T	A/T	G/C	嘌呤/嘧啶
人 类	30.9	19.9	19.8	29.4	1.05	1.00	1.04
羊	29.3	21.4	21.0	28.3	1.03	1.02	1.03
母 鸡	28.8	20.5	21.5	29.3	1.02	0.95	0.97
海 龟	29.7	22.0	21.3	27.9	1.06	1.03	1.05
鲑	29.7	20.8	20.4	29.1	1.02	1.02	1.02
海 胆	32.8	17.7	17.3	32.1	1.02	1.02	1.02
蝗 虫	29.3	20.5	20.7	29.3	1.00	1.00	1.00
麦 胚	27.3	22.7	22.8	27.1	1.01	1.00	1.00
酵 母	31.3	18.7	17.1	32.9	0.95	1.09	1.03
大 肠 杆 菌	24.7	26.0	25.7	23.6	1.04	1.01	1.03
金黄色葡萄球菌	30.8	21.0	19.0	29.2	1.05	1.11	1.07
噬菌体 T _v	26.0	24.0	24.0	26.0	1.00	1.00	1.00
噬菌体 λ	21.3	28.6	27.2	22.9	0.92	1.05	0.99
噬菌体 φ×174 (复制型)	26.3	22.3	22.3	26.4	1.00	1.00	1.00

此外，通过分析不同来源的 DNA 的碱基组成后还发现：DNA 的碱基组成没有组织或器官的特异性，即同一种生物的不同组织或器官具有相同的碱基组成；但 DNA 的碱基组成

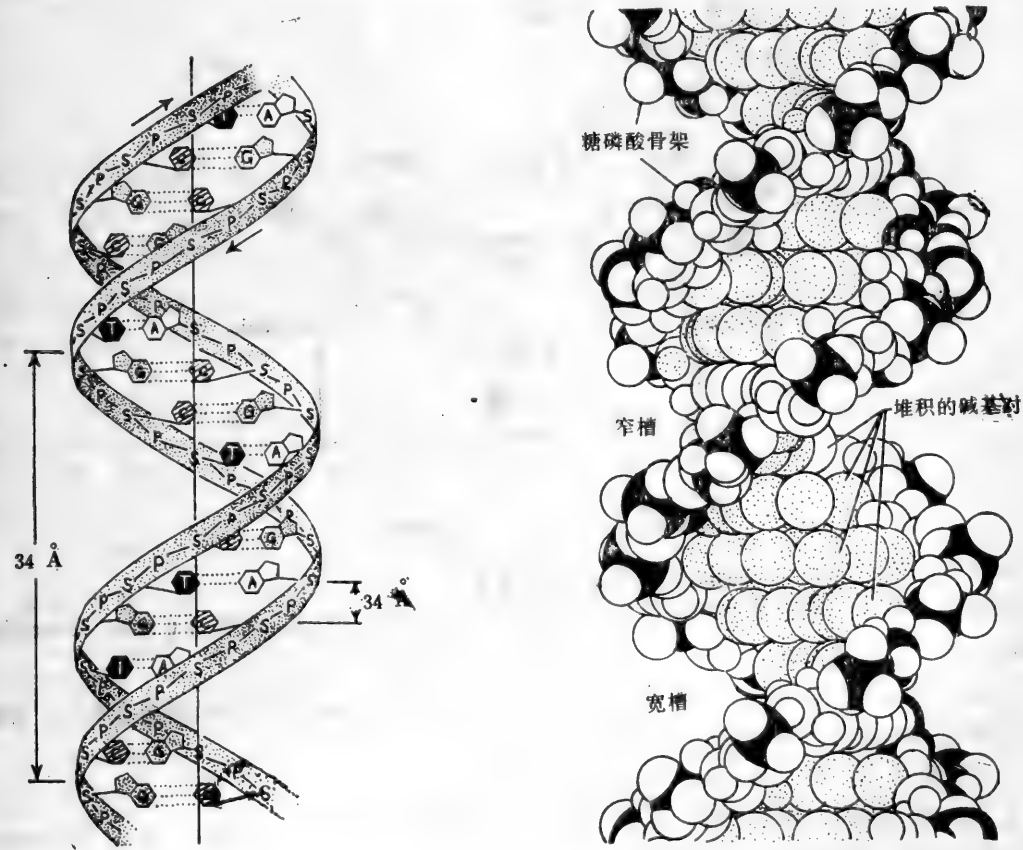
具有种属特异性，即不同生物的 DNA 具有它自己特殊的碱基组成。表4—8列举了不同来源的 DNA 的碱基组成。

二、DNA 分子的双螺旋结构

1950年，Wilkins 等人开始了对从动物细胞中提纯的纤维状 DNA 进行 X-射线晶体衍射图谱的研究，并把他们的实验结果与各种理论排列的分子模型所预示的结果相比较。发现嘌呤碱和嘧啶碱基以 3.4 \AA 的间距规则地排列在分子中，而且每10个核苷酸单位旋转一圈。因此，DNA 分子不是直线的，而是扭成螺旋状的。

1953年，Watson 和 Crick 根据 DNA 纳盐晶体的 X-射线衍射图谱以及碱基组成的规律，并综合参考其他一些研究结果，提出了 DNA 是由两条多核苷酸链构成的双螺旋分子，并制造出了 DNA 双螺旋结构模型。DNA 双螺旋结构模型具有如下特征（见图4-7）。

- ①两条多核苷酸链以相同的旋转绕同一个公共轴形成右手双螺旋，螺旋的直径为 20 \AA 。
- ②两条多核苷酸链是反向平行的，两条链的极性相反，即一条链的走向是 $5'\rightarrow 3'$ ，另一链的走向是 $3'\rightarrow 5'$ 。这对于碱基合适的空间组合是很重要的。



对图4-7 DNA 双螺旋结构模型：左边为简图，右边为空间结构模型。

- ③两条多核苷酸链的糖-磷酸骨架位于双螺旋的外侧，碱基平面位于链的内部。沿螺旋

轴方向看去，双螺旋表面有两个沟槽，一个宽槽和一个窄槽。这两个槽使碱基外露，其大小足够容纳蛋白质分子，因而对 DNA 和蛋白质的相互作用是很重要的。

④两条多核苷酸链之间按照 A—T、G—C 的碱基配对规律互补配对。A—T 之间形成两个氢键，G—C 之间形成三个氢键（见图4-8和图4-9）。两条链就是通过碱基对（base pair，简作 bp）之间的氢键联系的。相邻碱基对之间的轴向距离为 3.4 \AA ，每个螺旋的轴距为 34 \AA 。因此，每个螺旋含有10个碱基对，每个碱基对旋转 36° （图4-7）。

DNA 双螺旋结构是很稳定的，主要有三种作用力在其中起作用。

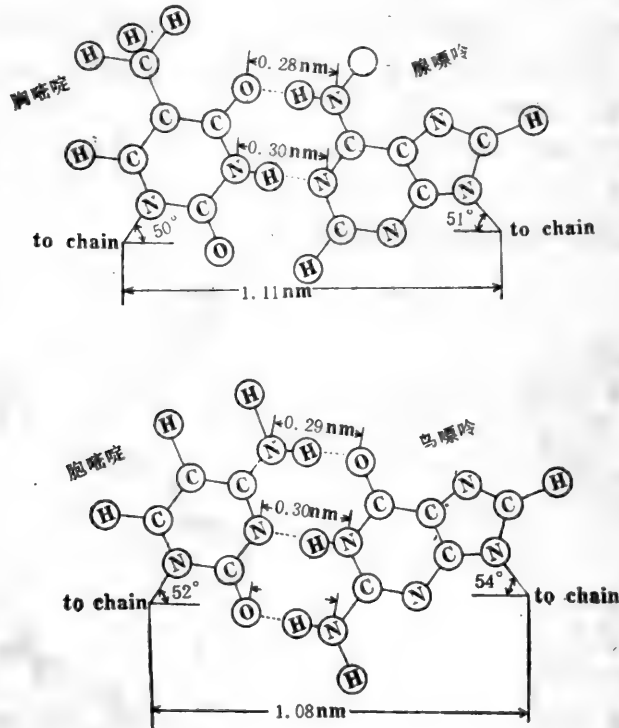


图4-8 DNA 分子中的碱基

①两条多核苷酸链间的互补碱基对之间的氢键。

②碱基对疏水的芳香环堆积所产生的疏水作用力，即所谓碱基堆积力（base stacking forces）。

③磷酸基团上的负电荷与介质中的阳离子或阳离子化合物，例如无机离子 Mg^{++} 、含碱性氨基酸较多的蛋白质等所形成的盐键。

上述三种力中以第二种作用力所起的作用最大。

人们分析了不同生物的 DNA 结构，都证实了 DNA 具有双螺旋结构。所以，Watson 和 Crick 提出的 DNA 分子双螺旋结构模型是正确的。

上述 DNA 双螺旋结构的特征是以 B-DNA 钠盐纤维为对象进行分析的结果。所谓 B-DNA 是指 DNA 钠盐纤维在相对湿度为92%时所处的状态。当外界条件发生变化时，双

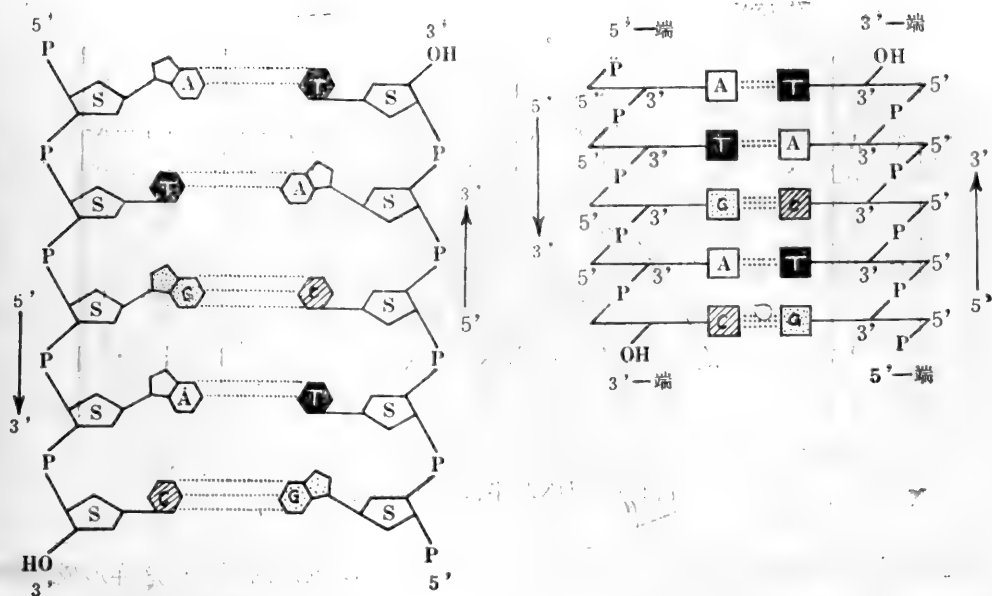


图4—9 DNA 分子中多聚核苷酸链的走向和糖-磷酸骨架
 左边为分子结构；右边强调互补链的相反极性。

螺旋的特征也会发生变化。当 DNA 钠盐纤维处在相对湿度为75%时，则以 A-DNA 状态存在。在相对湿度为66%时制成的 DNA 锂盐纤维，则以 C-DNA 状态存在。A-DNA 和 C-DNA 也是右手螺旋，但它们的双螺旋结构的螺旋距离以及碱基平面与中心轴间的关系等方面与 B-DNA 是有差异的（见表4-9）。一般认为，在溶液中以及在细胞内的生理条件下，DNA 分子最接近于 B 型。

表4-9 几种不同类型的右手双螺旋结构上的某些差异

类 型	碱基倾角	碱基夹角（旋转度数）	碱基升高	螺距	每个螺旋内的碱基对数
A-DNA 钠盐	20°	32.7°	2.56Å	28Å	11
B-DNA 钠盐	0°	36°	3.4Å	34Å	10
C-DNA 锂盐	6°	38°	3.31Å	31Å	9.3

DNA 双螺旋结构模型的意义是：

①根据碱基互补原则，即碱基配对规律，一条链的碱基顺序可以自动地决定与它互补的另外一条链的碱基顺序。这一点在 DNA 的半保留复制（semiconservative replication）中具有特别重要的意义。它为遗传信息的稳定和传递提供了分子机制。采用同位素示踪法证实了 DNA 合成是采取半保留的复制方式（图4-10）。这就是说，新合成的子代 DNA 分子的一条链来自亲代，另一条链则是按照碱基互补配对的原则合成的。按照半保留复制方式，亲代的遗传信息完整地传递给子代，子代就可以获得与亲代完全相同的遗传性状。

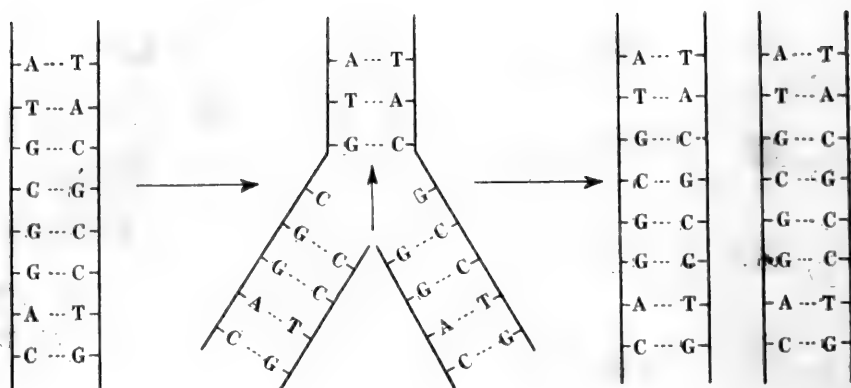
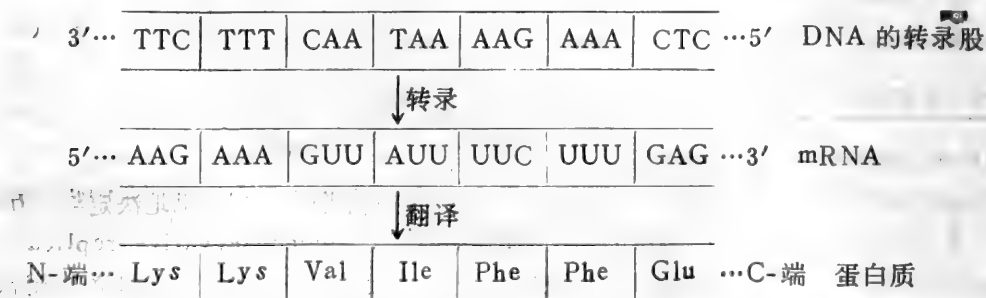


图4-10 DNA 半保留复制示意图

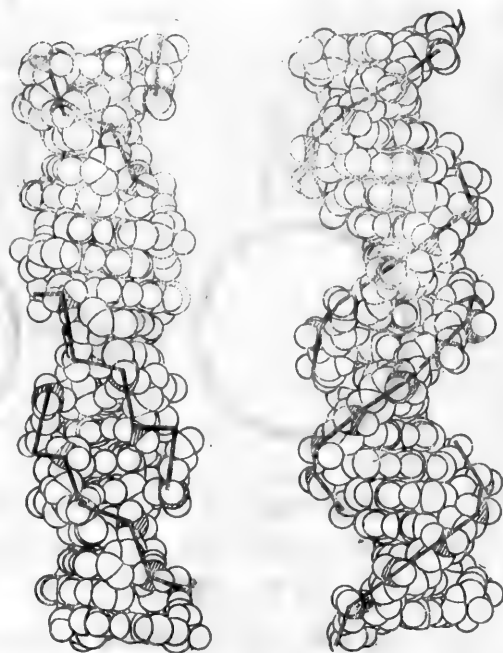
②反向平行的双螺旋可以在一条 DNA 链和一条 RNA 链之间形成。这样形成的两条链叫做 DNA-RNA 杂交链。在这种杂交分子中，碱基配对的规律是：dA-rU、dG-rC、dC-rG、dT-rA。这种碱基配对若出现在 RNA 聚合酶催化的转录中，就可以合成 RNA。细胞内的 RNA (tRNA、rRNA 和 mRNA) 都是以 DNA 为模板合成的。但是，DNA 上的遗传信息最终是以蛋白质形式表达。实验证明，蛋白质多肽链上的氨基酸顺序是由 DNA 上的一段核苷酸顺序规定的。规定一个蛋白质分子完整的氨基酸顺序的 DNA 片段就是一个基因。现在一般把编码蛋白质的基因和编码 RNA 的基因都称作结构基因。按照 Crick 的中心法则，在遗传信息的表达中，编码蛋白质的遗传信息首先转录给 mRNA，而 mRNA 才是合成蛋白质的直接模板。mRNA 线性顺序上的每三个核苷酸编码一个氨基酸，每三个核苷酸就称为一个氨基酸的遗传密码子（即三联密码）。因此，mRNA 的线性核苷酸顺序就决定了蛋白质的氨基酸线性顺序，而 mRNA 的核苷酸顺序是由 DNA 上的脱氧核苷酸顺序决定的。这就是说，DNA 上的遗传信息通过 mRNA 的传递最终以蛋白质的形式表达出来。DNA 和 mRNA 以及蛋白质之间的关系可表示如下：



tRNA 和 rRNA 上的信息不再表达为蛋白质，但是它们在蛋白质的生物合成中起很重要的作用。

1979年, A. Rich 等人通过对人工合成的脱氧六核苷酸 dCGCGCG 的 X-射线晶体衍射分析, 发现两分子的上述片段以左手双螺旋结构的形式存在于晶体之中。左手双螺旋结构与右手双螺旋结构有明显的不同 (图4-11)。由于左手 DNA 中磷原子的走向呈锯齿形 (Zig-Zag), 因此被命名为 Z-DNA。有人认为 Z-DNA 可能是 DNA 的一种稳定的构象, 生物很可能利用它。通过鼠和兔血中诱发的 Z-DNA 抗体, 发现天然 DNA 中有的部分可与 Z-DNA 的抗体结合。这提示在天然 DNA 中存在 Z-DNA 这种结构形式。关于 Z-DNA 结构在天然 DNA 分子中存在的广泛性, 以及在生物体内起什么作用等都有待于进一步研究。

还需要指出的是: 并不是所有的 DNA 都是双股的, ϕ X174 噬菌体 DNA 在病毒外壳内是以单链环状的形式存在的。但是当它感染宿主细胞并进行复制时, 它首先需要转变成双股的复制型。此外, 有些病毒 DNA 分子, 例如 λ -噬菌体 DNA, 它可以进行线型结构和环状结构的相互转换, 在病毒颗粒内它是双股线型的, 而当它侵入宿主细胞后则可以形成双股环状的结构。



Z-DNA

B-DNA

图4-11 Z-DNA 与 B-DNA 的结构模型比较

三、DNA 分子的超螺旋结构

DNA 的双螺旋结构是 DNA 的二级结构。以前人们认为所有生物的 DNA 都是线性的, 后来发现许多种 DNA 分子都是环状的。一般来说, 细菌、细菌质粒、一些 DNA 病毒、线粒体及叶绿体中的 DNA 都是环状的。环状 DNA 可以有超螺旋型 (Supercoil form) 和开环形型 (Opened circular form) 两种形式存在。所谓超螺旋结构通常是指共价、闭合的环状分子 (Circular covalent closed DNA) 在双螺旋结构基础上进一步扭曲而成的更高级的结构。环状 DNA 的超螺旋结构 (Superhelical structure) 是一种三级结构。在细胞内, 环状 DNA 就是以这种构象存在的。开环结构系指超螺旋结构在某些因素的影响下, 在一条链上出现缺口 (nick), 将超螺旋松开后的结构。

当 DNA 或是旋转不足 (underwound) 或是旋转过度 (overwound) 时, 都会使双螺旋内的原子偏离正常的位置, 在双螺旋中造成额外的扭转压 (torsional pressure) 或称张力。这种张力在环状分子中因无自由转动的末端, 不能释放出来, 但 DNA 分子具有维持 10 个碱基对一个右手双螺旋的倾向, 其结果是环状分子调整分子内部原子的位置使双螺旋扭曲 (twist) 产生超螺旋。

如果共价闭合的环状 DNA 双螺旋切开一股, 并且其中的一个末端绕互补股旋转 360° ,

当两个末端重新结合在一起时，一个交叉点便引入了这个分子（即产生一个超螺旋）（图4-12）。若旋转 720° 时，便引入两个交叉点。如果这个末端以与形成右手双螺旋旋转方向相反的方向旋转（解旋），这时因螺旋旋转不足，在两个末端重新结合后便会产生负的超螺旋（Negative supercoils）（环状分子右手扭曲），因而负的超螺旋是旋转不足的。业已证明，现在发现的所有天然 DNA 中的超螺旋都是负的超螺旋。

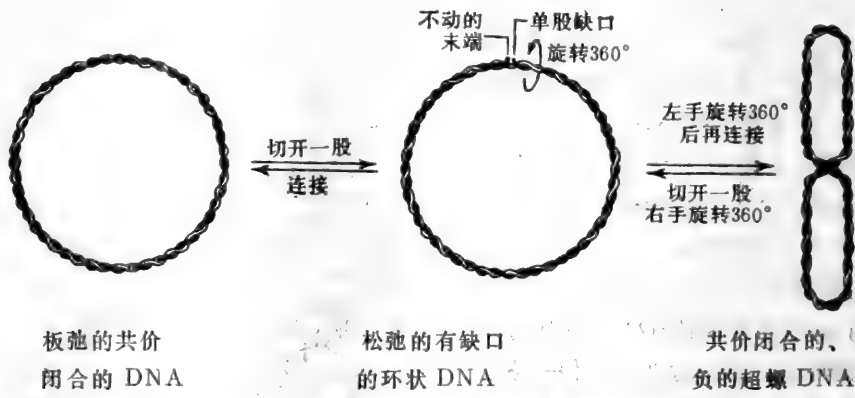
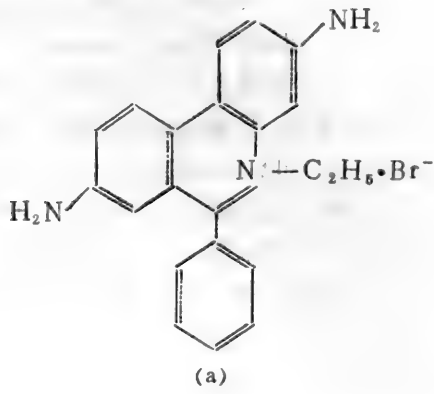


图4-12 超螺旋引入的形象化解释（并不代表体内酶促转换机制）

在负的超螺旋中，每个超螺旋圈可由约200个碱基对形成，换句话说，双螺旋中的每个螺旋（10bp）可形成0.05个超螺旋圈。因此就引出了所谓超螺旋密度（Superhelix density）的概念。超螺旋密度是这样定义的：每10个碱基对的超螺旋圈数。大多数共价闭合的环状DNA在中性氯化铯溶液中的超螺旋密度为 -0.05 。

如果上面所说的那个自由末端以与形成右手双螺旋方向相同的方向旋转，这时因螺旋旋转过度，在两个末端重新结合后便会产生正的超螺旋（Positive supercoils）（环状分子左手扭曲），因而正的超螺旋是旋转过度的，正的超螺旋能利用扭转压使双螺旋结构更加紧密。正的超螺旋在天然DNA中并不存在，但在体外经过处理可以得到。

溴化乙锭（分子式见下）能够插入到DNA双螺旋碱基对之间的空间中，减少DNA的超螺旋密度，从而使超螺旋松开。随着溴化乙锭量的增加，DNA负的超螺旋不仅可以完全松开，甚至可以进一步引入正的超螺旋（图4-13）。



扭曲。由此看来,真核生物染色体 DNA 分子可以在染色体中卷曲成更复杂更高级的结构。超螺旋结构对涉及 DNA 的许多过程都是很重要的。许多酶或蛋白质只与超螺旋结构结合。例如,拓扑异构酶 (topoisomerases) 能够通过超螺旋引入或解除而调节超螺旋的程度,从而影响 DNA 的复制以及基因的差别表达。

四、DNA 的顺序分析

DNA 的核苷酸顺序测定是研究 DNA 结构的一项极为重要的工作,测定 DNA 核苷酸顺序的基本原则与测定蛋白质氨基酸顺序的原则是相似的。

①首先要获得高纯度的、均一的完整 DNA 或 DNA 的某个 (或某几个) 基因片段;②用 DNA 限制性内切酶降解,以获得一套大小不同的碎片 (fragments), 并确定这些片段在原来大分子中的前后顺序;③测定每个片段的核苷酸顺序。大致经过这样几个基本环节即可完成 DNA 分子的完整的核苷酸顺序测定。

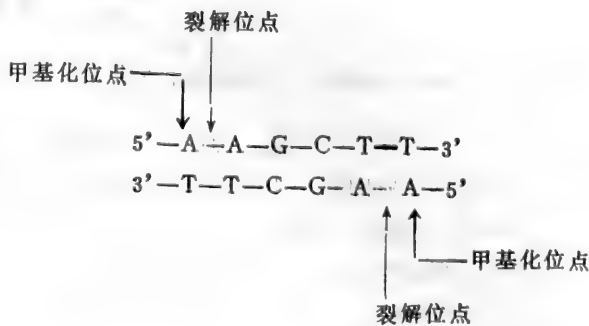
这里需要指出的是,不同的核酸都具有相同的糖-磷酸骨架,各种核酸之间的差别仅表现在与骨架上的糖残基相连的碱基上。即是说,核苷酸排列顺序的不同,实际上是指碱基顺序的不同。可见测定核酸的核苷酸顺序就是测定它的碱基顺序。

(一)DNA 限制性内切酶

1. DNA 的限制与修饰

DNA 限制性内切酶 (restriction endonucleases) 首先是从大肠杆菌细胞中分离到的。DNA 限制性内切酶的一个显著的生物学作用是它们能使侵入细菌细胞的外源异种 DNA 降解,却不降解自身的 DNA。这表明细菌除具有限制能力外,还具有另外一种使自身 DNA 免于降解的能力,即能使被限制性内切酶识别的部位加以修饰的功能。这就是说,细胞具有一种限制与修饰系统。限制是为了降解入侵的外源 DNA;修饰 (modification) 是为了保护内源 DNA,使其不被自身的限制性内切酶降解。

当某种噬菌体 (Phage) 从它原有的宿主细菌细胞中转移到另一种细菌中后,它的感染率要减少几千倍。但是,当把那些存活下来的子代噬菌体重新感染后一宿主时,它却能正常地生长。第一次感染时,由于后一种宿主细菌细胞内的限制性内切酶的降解,所以幸存者很少。幸存者是由于在被降解之前已被后一种宿主修饰酶修饰,因而免遭降解。具有修饰标记的子代噬菌体再次感染后一种宿主时也就不再被限制了。



(a)

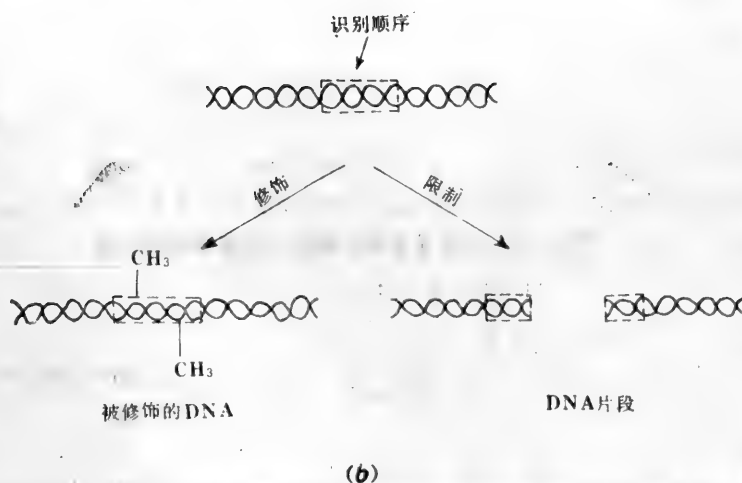


图4-15 (a)HindⅢ 和相应甲基化酶的识别与作用位点(b)识别部位的甲基化阻止相应的限制性内切酶降解。

在细菌中，DNA 的限制与修饰是对立统一的。DNA 的修饰作用具有严格的特异性，是由特异性的修饰酶（主要是甲基化酶）来完成的。甲基化酶的识别和修饰部位往往与限制性内切酶的识别和作用部位相同。因此，宿主特异的甲基化酶与特异性的限制性内切酶同时成对存在。

2. 两类限制性内切酶

已经从不同种类的细菌中分离到了许多 DNA 限制性内切酶。限制性内切酶有两种类型，即类型 I 和类型 II。

类型 I 限制性内切酶是一类复杂的多功能酶，它们既降解 DNA，又能修饰 DNA，而且还具有 ATP 酶的功能。这类酶在结构上比较复杂，由多个亚基组成。

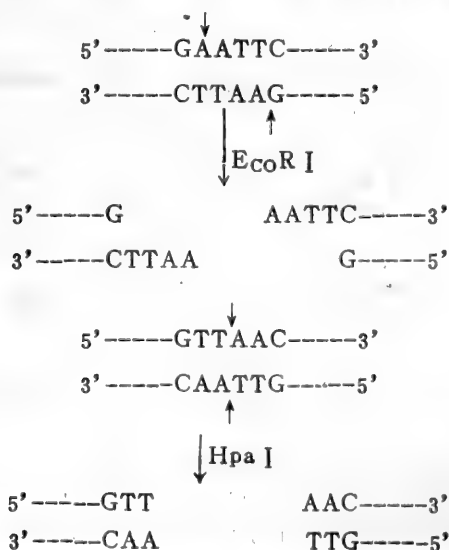


图4-16 限制性内切酶作用于 DNA 时产生粘性末端或平齐末端

类型Ⅱ限制性内切酶是一类较为简单的酶。这类酶既不表现出甲基化酶的活性，也不表现出 ATP 酶的活性。但是它们能识别 DNA 分子上特殊的部位。如果这个部位未被修饰，就会在这个部位上降解 DNA。类型Ⅱ限制性内切酶的识别部位一般都是4—6个核苷酸对的特定顺序。识别部位呈二重旋转对称。有些酶，例如 EcoRI 作用于 DNA 时，在它的识别部位处产生粘性末端 (cohesive termini)；有些酶，例如 HaeⅢ 和 HpaⅠ 作用于 DNA 时，在它们的识别部位上产生平齐的末端 (even termini) (图4—16)。

表4-10 类型Ⅱ中的几种常用的限制性内切酶

酶	识别顺序	来源
EcoRⅠ	$ \begin{array}{c} \downarrow \\ 5'-GAATTC-3' \\ 3'-CTTAAG-5' \\ \uparrow \end{array} $	<i>E. coli</i> RY13
EcoRⅡ	$ \begin{array}{c} \downarrow \\ 5'-NCCAGGN-3' \\ 3'-NGGTCCN-5' \\ \uparrow \end{array} $	<i>E. coli</i> R245
HindⅢ	$ \begin{array}{c} \downarrow \\ 5'-AAGCTT-3' \\ 3'-TTCGAA-5' \\ \uparrow \end{array} $	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd
HpaⅠ	$ \begin{array}{c} \downarrow \\ 5'-GTTAAC-3' \\ 3'-CAATTG-5' \\ \uparrow \end{array} $	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>
HpaⅡ	$ \begin{array}{c} \downarrow \\ 5'-CCGG-3' \\ 3'-GGCC-3' \\ \uparrow \end{array} $	同上
HaeⅢ	$ \begin{array}{c} \downarrow \\ 5'-GGCC-3' \\ 3'-CCGG-5' \\ \uparrow \end{array} $	<i>Haemophilus aegyptius</i>
AluⅠ	$ \begin{array}{c} \downarrow \\ 5'-AGCT-3' \\ 3'-TCGA-5' \\ \uparrow \end{array} $	<i>Arthrobacter luteus</i>
PstⅠ	$ \begin{array}{c} \downarrow \\ 5'-CTGCAG-3' \\ 3'-GACGTC-5' \\ \uparrow \end{array} $	<i>Providencia stuartii</i>
BglⅡ	$ \begin{array}{c} \downarrow \\ 5'-AGATCT-3' \\ 3'-TCTAGA-5' \\ \uparrow \end{array} $	<i>Bacillus globiggi</i>
BamHⅠ	$ \begin{array}{c} \downarrow \\ 5'-GGATCC-3' \\ 3'-CCTAGG-5' \\ \uparrow \end{array} $	<i>Bacillus amyloliquifaciens</i> H

限制性内切酶的命名采用 Nathans 等人的方案。以 EcoRⅠ 为例予以说明。第一个字母 E 是大肠杆菌 (*E. coli*) 的属名的第一个字母，用大写；名称的第二、三个字母 co 为它的种名的头两个字母，用小写；第四个字母 R 表示大肠杆菌的株系；最后是用罗马字大写的数

字表示同一菌株中的不同的限制性内切酶的编号。表4—10列举了一些常用的限制性内切酶。

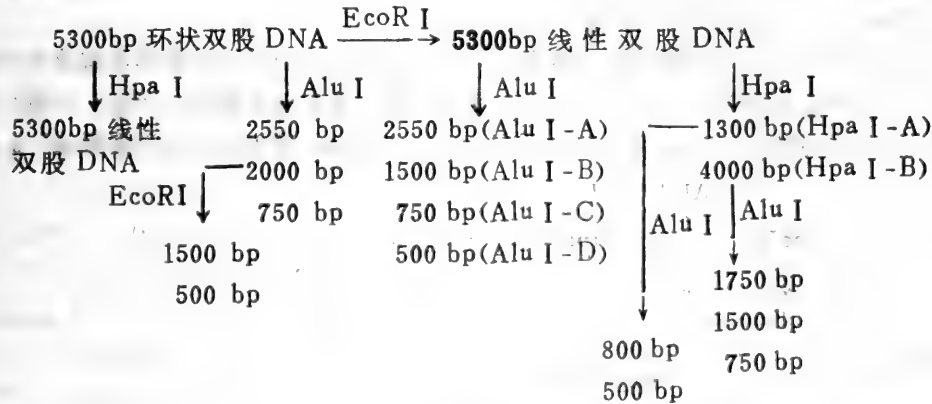
类型Ⅱ中的许多酶引起了分子生物学家的广泛注意，因为这类酶在研究 DNA 的结构以及遗传工程操作中具有重要的应用。

(二)DNA 的酶切图谱

一个 DNA 分子用限制性内切酶降解后得到许多大小不同的片段，确定这些片段在 DNA 大分子中原来占据的位置，即可得到一种图谱。这样的图谱就叫做物理图谱 (Physical map) 或酶切图谱。目前常用的酶切图谱分析方法很多，其中主要有部分酶切法、交叉酶切法、末端标记部分酶切法。这里我们仅介绍交叉酶切法。

在用限制内切酶切割 DNA 分子后，所得到的 DNA 碎片可以选用合适浓度的琼脂糖凝胶或聚丙烯酰胺凝胶进行电泳，把它们分开。这些片段的大小能从电泳移动的距离推算出来，因为片段移动的距离与片段分子量的对数成反比，即分子量小的电泳泳动的速度比分子量大的泳动速度大。

有一假想的环状双股 DNA 分子，现采用三种 DNA 限制性内切酶作交叉酶解，得到如下的结果：



该环状 DNA 分别用 EcoRI 和 HpaI 切割均可得到一线性 DNA 分子，表明这两种酶分别只有一个切点。当环状 DNA 用 AluI 切割时，可产生三个片段，表明该酶在 DNA 分子上有三个点，而当用 AluI 处理用 EcoRI 得到的线性分子时，可得到四个片段。从上述结果分析表明，EcoRI 的切点位于2000bp片段上，因为这可以通过用 EcoRI 处理该片段产生的1500 bp 和 500 bp 的两个更小的片段来证实。我们可以把 EcoRI 的切点作为 构筑物理图谱的参考点 (图4-17)。

当用 HpaI 处理用 EcoRI 酶解所得到的线性分子时，可以得到 1300 bp(HpaI-A) 4000'bp (HpaI-B)两个片段。这是可以想象得到的，因为这两个酶均只有一个切点。当 1300 bp 和 4000 bp 用 AluI 处理时，可分别得到两个片段 (500 bp 和 800 bp) 和三个片段 (1750 bp、1500 bp 和 750 bp)。这表明整个 DNA 分子用这三种酶处理时总共可产生五个片段，因为这五个片段的总大小是5300 bp。请注意，这里用 AluI 处理 HpaI-A 和 HpaI-B 后分别产生 500 bp HpaI-A 和 1500 bp HpaI-B 这两个片段。这两个片段的大小 (500 + 1500) 刚好与 AluI 处理环状分子时所得到的2000 bp 片段的大小相同 (已被用为构筑物理图谱的起始件)，也与线性分子用 AluI 处理所得的 AluI-B和 AluI-D 的加

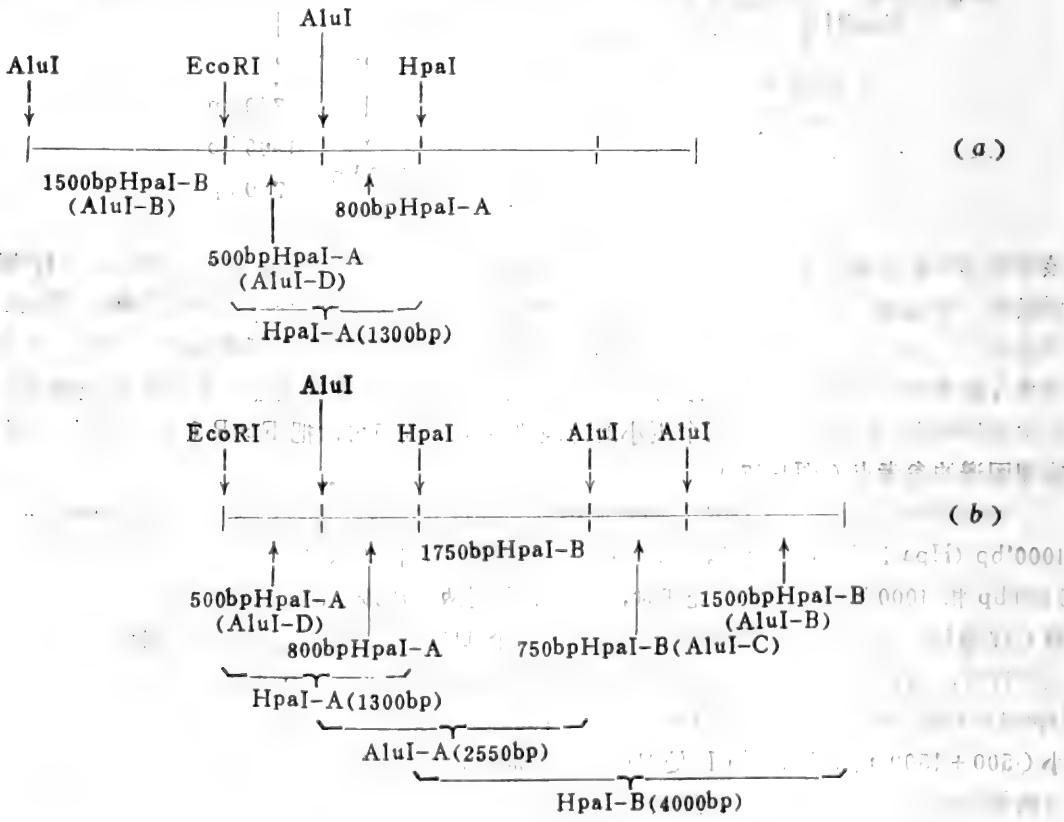
和大小相同。这说明 Alu I-B 和 Alu I-D 是相邻的，也表明 Alu I-B 与 1500 bp Hpa I-B 为同一部位的片段，Alu I-D 与 500 bp Hpa I-A 为同一部位的片段。而 1300 bp (Hpa I-A) 的大小又刚好与 Alu-D 相关，因为 Alu I-D (500 bp) 加 800 bp Hpa I-A 等于 1300 bp。因此这几个片段的相应位置可以先确定 (见图 4-17(a))。

Hpa I-B 用 Alu I 处理产生的 1750 bp Hpa I-B 和 Hpa I-A 用 Alu I 切割产生的 800 bp Hpa I-A 这两个片段相加刚好与 Alu I-A (2550 bp) 的大小一致。这说明 Hpa I 的切点位于 Alu I-A 范围内。那么，1750 bp Hpa I-B 片段与 800 bp Hpa I-A 片段相邻，Alu I-A 与 Alu I-D 相邻。进一步推理可知 Alu I 切割 40000 bp (Hpa I-B) 产生的第三个片段 (750 bp Hpa I-B) 必定是与 1750 bp Hpa I-B 相邻，而 750 bp Hpa I-B 片段又与 1500 bp Hpa I-B 片段相接。Alu I-C 的大小与 750 bp Hpa I-B 相同，因此，Alu I-C 与 750 bp Hpa I-B 是相同部位的片段，Alu I-C 的位置也就确定了，即 Alu I-C 与 Alu I-B 和 Alu I-A 相邻 (见图 4-17(b))。

从上面总的分析，我们便可以得到整个环状 DNA 分子的酶切图谱 (图 4-17(c))，从而也可以帮助理解交叉酶切法所包含的基本内容。

(三) DNA 片段的核苷酸顺序测定

一旦用 DNA 限制性内切酶获得合适大小的 DNA 片段，即可用两种非常有效的方法测定 DNA 片段的核苷酸顺序。一种是 Sanger 及其同事在他们自己建立的“加”“减”法基础上发展起来的“链终止法”，另一种是 Gilbert 和 Maxam 建立的“化学裂解法”。



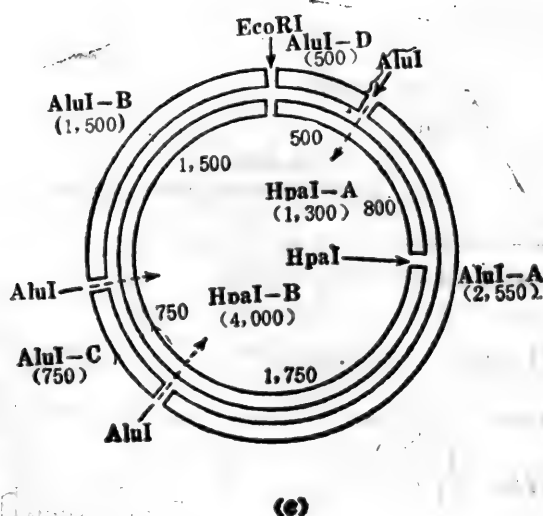
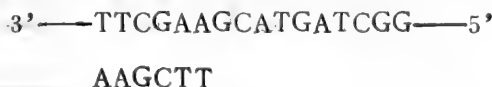


图4-17 一假设的环状 DNA 的酶切图谱

1. 链终止法 (Chain termination method)

链终止法是利用 5'-脱氧核苷三磷酸 (5'-dNTP) 的类似物取代 DNA 链合成所需要的正常底物 5'-dNTP。最常用的底物类似物是 2',3'-双脱氧核苷三磷酸 (2',3'-ddNTP)。在 DNA 链合成过程中, 由于 2',3'-ddNTP 的 C_{3'} 位没有 -OH, 当 2',3'-ddNTP 参入到延长链的末端时, DNA 链的合成便终止。由于终止的部位是随机的, 所以可以获得任何一种长度的 DNA 片段。然后通过凝胶电泳分离, 再经放射性自显影, 从放射自显影的胶片上直接可以读出 DNA 的核苷酸顺序。这个方法简便、快速而准确。现举例说明。

现有一假设的 DNA 片段, 首先加上一小段与该 DNA 片段能互补的核苷酸片段作为启动 DNA 新链合成引物。引物的核苷酸顺序是已知的, 这可用某限制性内切酶产生。



分成四组, 然后每组加入四种 5'-dNTP (其中一种含放射性标记) 和一种 5'-ddNTP, 并加入大肠杆菌 DNA 聚合酶 I (见 DNA 合成的有关内容), 满足 DNA 合成所需要的条件, 进行与该片段互补的新链的合成。当加入的那种 5'-ddNTP 参入到链的末端时, 由于该类似物脱氧核糖的 C_{3'} 位没有 -OH, 不能与下一个核苷酸形成 3',5-磷酸二酯键, 于是链的延伸就到此终止。假如加入的是 dGTP 的类似物 ddGTP, 那么链的延伸就会在鸟苷酸残基的部位上终止 (如图4-18所示)

此法的关键点是双脱氧核苷三磷酸与天然的脱氧核苷三磷酸的比例, 例如 ddGTP 与 dGTP 的比例, 以保证以随机的方式正确地终止在所需的位置。

2. 化学裂解法 (Chemical cleavage method)

化学裂解法所依据的原理是: 把末端标记的 DNA 片段用专一性的化学试剂分别在 A、

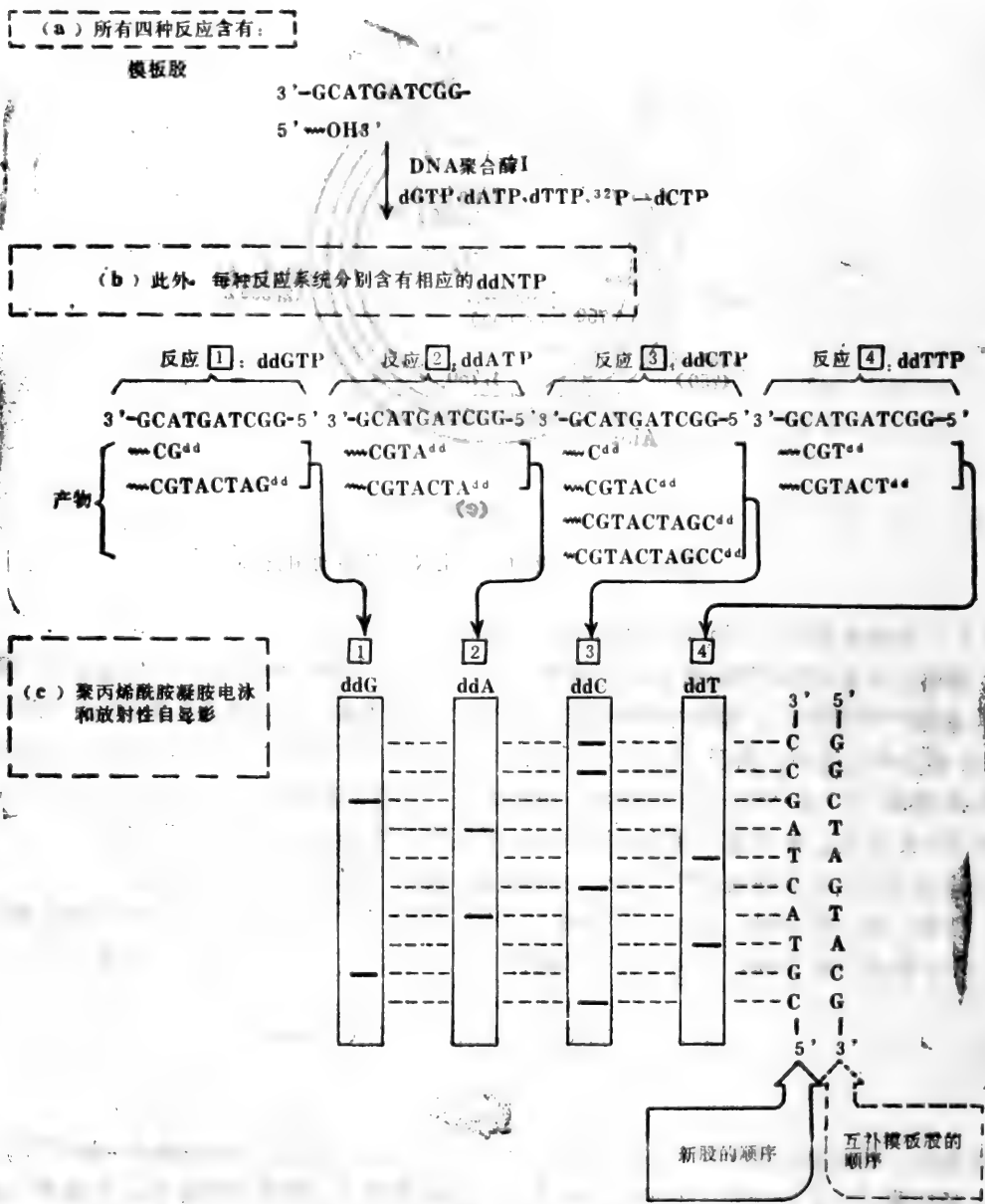
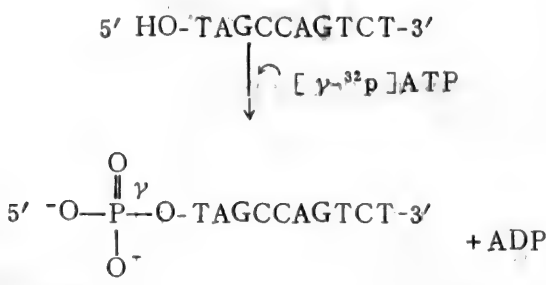


图4-18 链终止法测定 DNA 片段核苷酸顺序

G、C、T 四种脱氧核苷上进行处理, 使其随机地部分裂解, 由此得到各种长度不等的末端含有放射性标记的四组片段; 然后将这四组片段在聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳分离。从它们的放射性自显影图谱上直接读出 DNA 的核苷酸顺序。

用化学裂解法测定 DNA 的核苷酸顺序之前, 需要对末端进行 ^{32}P 标记, 无论是单链还是双链都可以进行标记, 但双股标记之后, 需将两股分开, 尔后再进行顺序分析。在标记之前, 若末端含有磷酸基团, 则需要用碱性磷酸酶 (alkaline-phosphatase) 处理除去末端磷

酸基。然后用多聚核苷酸激酶 (polynucleotide kinase) 将 $[\gamma\text{-}^{32}\text{p}]\text{-ATP}$ 上的 $\gamma\text{-}^{32}\text{p}$ 转转移到 DNA 片段的5'-端上。(若标记3'-末端, 则应该用末端转移酶 (terminal transferase) 将 $[\alpha\text{-}^{32}\text{p}]\text{-ATP}$ 上的 $\alpha\text{-}^{32}\text{p}$ 转移到 DNA 片段的3'-末端上。)



(1) 在嘌呤碱基位上选择性裂解处理

在一定条件下用硫酸二甲酯 (dimethylsulfate, 简称 DMS) 处理 DNA 片段, 即可选择性地使鸟嘌呤 N₇ 和腺嘌呤 N₃ 位甲基化, 从而可以保证单股 DNA 上的甲基化的嘌呤碱基随机分布。由于甲基化的嘌呤糖苷键不稳定, 故在中性 pH 下加热 (90℃), 很容易使嘌呤碱基脱落下来。当用 0.1 mol/L 碱于 90℃ 处理时, 脱去嘌呤碱基后的糖从邻近的磷酸基上断裂下来。由于 G 比 A 甲基化的速度快五倍, 所以当产生末端含标记的碎片在凝胶上电泳分离后, 放射性自显影胶片上就会显示出深浅不一的带。深色的是 G 裂解得到的碎片, 浅色的是 A 裂解得到的碎片 (即所谓强 G 弱 A, 或用 G>A 表示)。

甲基化的腺苷的糖苷键比甲基化的鸟苷的糖苷键对酸更不稳定。因此, 用稀酸温和地处理 (0℃), 则优先释放出 A。随后用碱处理 (90℃) 使其断裂。电泳分离后进行放射性自显影。深色的带相当于 A, 浅色的带相当于 G (强 A 弱 G, 即 A>G)。

(2) 在嘧啶碱基上选择性裂解处理

用肼 (Hydrazine, H₂N·NH₂) 处理 DNA 片段, 可以使 DNA 上的嘧啶碱基随机地消去, 肼可以进一步与糖反应产生脒。这就能在其后的哌啶 (piperidine) 裂解反应中保证产生大小不同的碎片。肼解反应是在 15—18 mol/L 的水合肼中进行的。部分肼解之后, 用 0.5 mol/L 的哌啶使 DNA 片段在 T 和 C 处断裂。电泳分离后进行放射性自显影, 即可以显现出深浅一致的 T 和 C 带 (即 C+T)。

若在肼解反应中加入 2 mol/L NaCl, 则选择性地抑制肼同 T 的反应。那么当用哌啶进行裂解反应时, 只能从 DNA 片段上的 C 处断裂。在放射性自显影胶片上只出现 C 带。

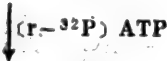
上述片段用 ³²P 标记后, 用化学裂解法处理所测定的核苷酸顺序如图 4—19 所示。

化学裂解法是测定 DNA 核苷酸顺序的一种十分有效的方法。只相差一个核苷酸的片段都可以分辨得出来。当然这主要取决于凝胶电泳的分辨率。在 40 厘米的凝胶板上, 可以毫不含糊地从标记的一端测定出 100—200 个核苷酸的顺序。

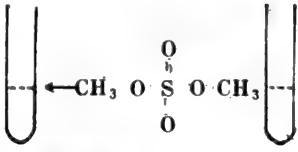
五、DNA 分子组织结构的某些特点

DNA 分子是很大的。一个病毒 DNA 分子就有好几千碱基对, 细菌染色体 DNA 分子

(a) 末端标记:

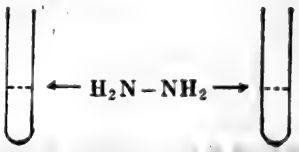


(b) 化学裂解



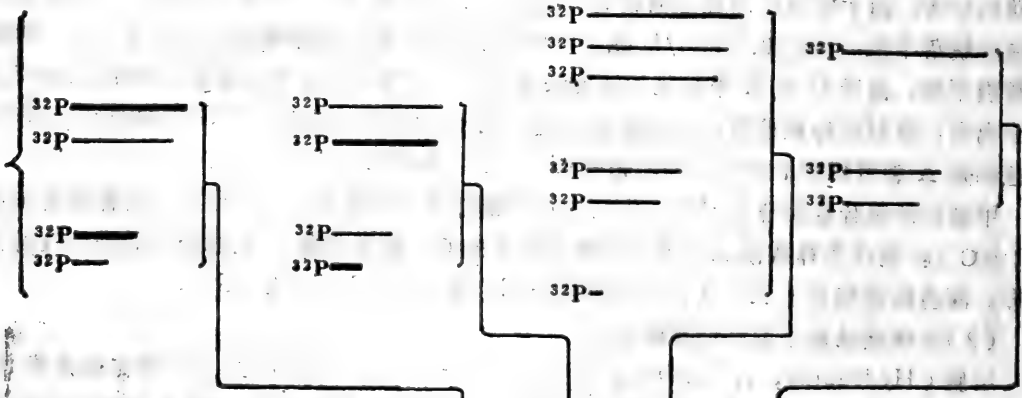
中性加热后
用碱处理

酸性加热后
用碱处理



用脲啶处理

在胍解中加入
NaCl后
用脲啶处理



(c) 聚丙烯酰胺凝胶
电泳和放射性自显影

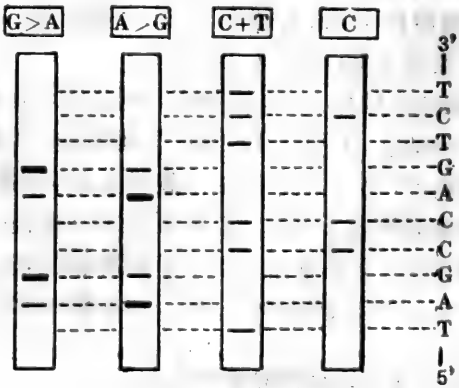


图4-19 化学裂解法测定 DNA 顺序

的碱基对就有几百万;真核生物的染色体 DNA 比原核生物的染色体 DNA 大三个数量级。由于对功能性基因的实际数目缺乏确切的了解,因此目前很难将 DNA 的大小同它实际编码的能力完全联系起来。一个很小的病毒 DNA 分子似乎小到不足以为所有的病毒蛋白编码,但是,实际上它又把它过量的信息压缩到它的 DNA 分子中。另一方面,在真核生物中所估测到的功能性基因数要比所计算的 DNA 的编码潜力低几个数量级。近十多年来,由于核酸研究方法的进步,核酸结构的研究也随之取得了很大的进展。人们利用分子杂交配合电子显微镜观察、核酸复性动力学研究、DNA 和 RNA 核苷酸顺序的测定等方法,已经揭示出核酸结构组织上的某些特点,对上述疑点已显露出可解答的实验依据。

1. 基因重叠

以前认为基因是不重叠的,即是说, DNA 上的一个编码区段的核苷酸顺序只能以一种方式编码一种蛋白质。但是,已发现这种传统的观点已在某些小病毒 DNA 分子中有例外。例如,噬菌体 ϕ X174 DNA 是由 5375 个核苷酸组成的单股环状 DNA 分子。它含有九个基因。一般来讲, ϕ X174 DNA 的 5375 个核苷酸不足以编码九种不同的蛋白质。但是,把它的核苷酸顺序与它的九个基因的核苷酸顺序相对应,把已知氨基酸顺序的噬菌体蛋白也与其排列对照,并结合其他方面的研究,发现了一种令人惊叹的基因排列方式(图 4—20)。A 基因和 B 基因相互重叠(B 基因完全被包在 A 基因范围内),D 基因和 E 基因相互重叠,D 基因从核苷酸 390 延伸到 846,而 E 基因则起始于核苷酸 566,终止于核苷酸 840。不同基因在核苷酸顺序上相互重叠的现象就叫做基因重叠。根据分析,A 蛋白(A 基因的产物,与 DNA 的复制有关)和 B 蛋白(B 基因的产物,与病毒颗粒包装有关),D-蛋白(D-基因的产物,与病毒衣壳形成有关)和 E 蛋白(E 基因的产物,与宿主的溶菌作用有关)的氨基酸顺序都是不同的。这种在同一段 DNA 顺序中能获得合成不同蛋白质的信息,是由于以不同的方式识读 DNA 的核苷酸顺序,即识读三联密码子的起始点不同的结果(图 4—21)。

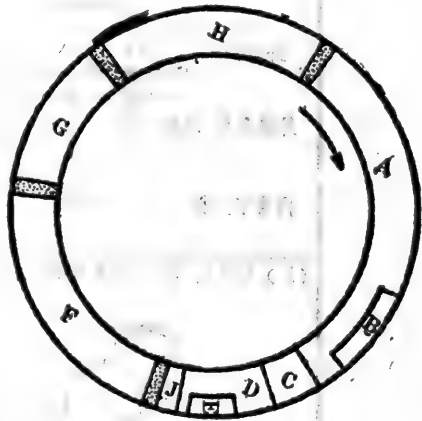


图4-20 ϕ X174 DNA 中的基因排列

D 蛋白 Ala—Glu—Gly—Val—Met 终止
 GCGGAAGGAGTGATGTAATGTCA.....
 E 蛋白 Arg—Lys—Gly 终止 起始 Ser—.....J蛋白

图4-21 以不同方式识读同一DNA顺序,产生不同的蛋白质

从图 4—21 我们可以看出, D 基因和 E 基因在同一段 DNA 顺序中以不同的方式编码两种不同的蛋白质(D 蛋白和 E 蛋白),同时还可以看出 D 基因的终止密码子 TAA 与 J 基因的起始密码子 ATG 相重叠。

基因重叠现象在噬菌体 G_{ϕ} 基因组也存在。基因重叠对于某些病毒来说能够有效地利用 DNA 分子的信息含量。就 $\phi X174$ 来说，它的 DNA 大小严格受到外壳体积的限制，不可能增大太多。因此，它必须充分利用它的 DNA 信息才能得以生存。

基因重叠现象是否具有普遍性，现在还不能断言。这种现象并不限于细菌病毒，而且在猴病毒 SV40 的基因组中也有发现。

2. 基因中的插入顺序

通过 DNA 和 RNA 杂交观察，以及通过 DNA 和 RNA 的核苷酸顺序的比较，发现许多来自真核生物的基因和它的转录产物 RNA 并不等长，在基因中存在一段或几段非编码顺序，即插入顺序 (intervening sequence)。也就是说，一个完整的结构基因被插入顺序隔开。被插入顺序分开而间断的结构基因即称为“断裂基因”或“分隔基因”。基因的编码区称为外显子 (exon)，而其间的插入顺序则称为内含子 (intron)

例如，小鼠 β -珠蛋白基因含有116个和664个碱基对的插入顺序。有人测得鸡卵白蛋白的基因的总长度约为7700个碱基对，其中只有 1158 个核苷酸编码卵白蛋白的386个氨基酸。

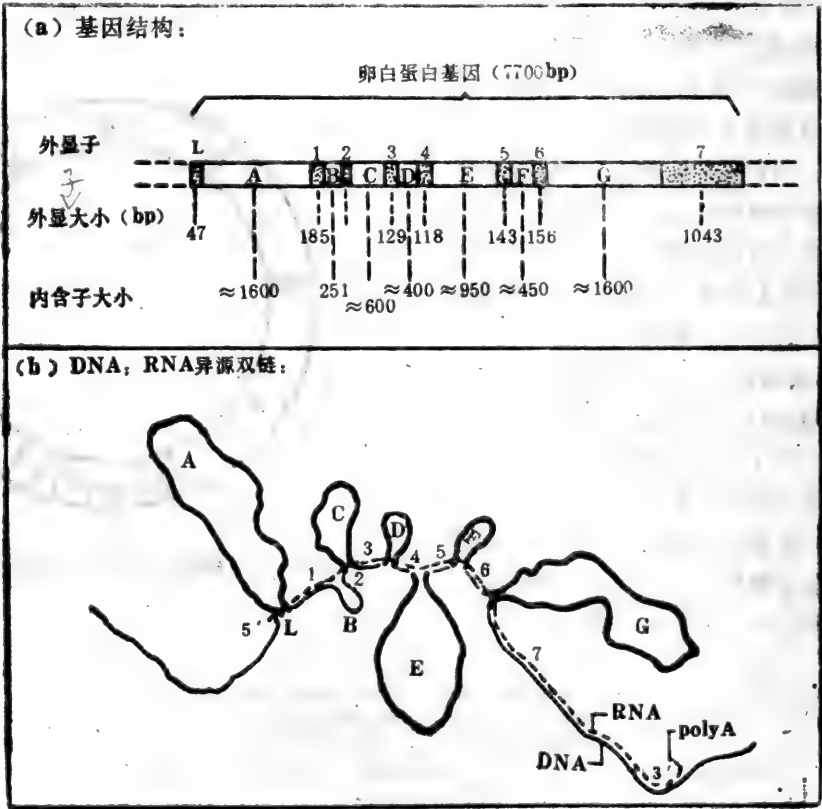


图4-22 鸡卵白蛋白的基因结构

(a): 基因中的插入顺序，L 和数字表示外显子 (L 为前导顺序)，字母表示内含子；(b) 异源双链术显示出卵白蛋白基因和它的转录产物 mRNA 并不等长。

这个基因含有六个插入顺序，把一个完整的结构基因分隔成七个编码区（图 4—22）。细胞色素 b 的基因也被四个插入顺序分隔成五个编码区。从图 4—22 以及上面的数字，我们可以看出，插入顺序比一个基因的编码区还要大。免疫球蛋白基因、胰岛素基因等许多被检测过的真核生物基因中都含有插入顺序。在腺病毒和 SV40 等动物病毒中的蛋白质基因也同样检测出插入顺序。此外，在真核生物的某些 rRNA 基因和 tRNA 基因中也发现有插入顺序。看来，插入顺序在真核生物中具有普遍性。

以前人们认为基因和基因产物是等长的，即任何 mRNA 的核苷酸顺序都是相应基因的核苷酸顺序的一个精确的互补复本。在原核生物中，目前看来的确如此。然而，在真核生物中，由于插入顺序在基因中检出，人们理所当然会对上面的观点作些修正。因为在真核生物中，很多基因实际上都是由外显子和内含子相间排列的镶嵌结构。实验证明，成熟的 mRNA 是它的前体（基因的真实复本）剪去插入顺序后拼接而成的。很多人认为，插入顺序把一个基因隔开的这种组织方式在进化和调控上是有特殊意义的。

3. 重复顺序 (Repetitive sequences)

在真核生物染色体 DNA 中有许多重复出现的核苷酸顺序。从 DNA 复性动力学观察，真核生物 DNA 可分为三部分：高度重复顺序、中度重复顺序和单一顺序。

高度重复顺序在 DNA 分子中重复次数很高，可达几百万次。因此，这部分 DNA 复性速度很快。高度重复顺序在整个 DNA 分子中所占的比例因不同种属而异，一般在 15 % 左右。在人的染色体 DNA 中约占 20%，在小鼠染色体 DNA 中约占 10%。高度重复顺序的碱基组成不同于其他部分，故在氯化铯密度梯度超离心时可显示出额外的小峰，称为“卫星峰”，卫星 DNA (Satellite DNA) 的名称即由此而来。卫星 DNA 的重复单位一般由 2—10 个碱基对组成，成串排列。有些重复单位由较长的核苷酸顺序组成。例如用限制性内切酶 Hind III 降解非洲绿猴的染色体 DNA，可获得重复单位为 172 个碱基对的高度重复序列。

一般认为高度重复顺序不被转录（也有被转录的个别报道），这可能与生物进化和基因表达的调节控制有关。

中度重复顺序是指重复次数在 DNA 分子中出现十几次至几千次的部分，其复性的速度比高度重复顺序慢，但比单一顺序快。它们或是成串排列，或是与单一顺序相间排列。中度重复顺序在整个 DNA 分子中所占的比例随种属差异而有别。在人体中占 12% 左右，在小鼠中约占 20%。

中度重复顺序有些是编码区，如 rRNA 基因、tRNA 基因、组蛋白基因、免疫球蛋白基因等。所以，上述这些基因都属于中度重复顺序之列，有多拷贝基因之称。有些中度重复顺序是非编码区，与基因的表达调控有关。

单一顺序在 DNA 分子中只出现一次或几次，因而复性速度最慢。绝大多数编码蛋白质或酶的结构基因属于单一顺序，因此这样的基因称为单拷贝基因。单一顺序约占单倍体 DNA 的 50% 以上，代表了生物巨大的遗传信息。

在原核生物中，重复顺序很少存在。在大肠杆菌中，核糖体 RNA 基因和有些 tRNA 基因是重复的，但重复的次数不多。绝大多数基因是单拷贝的。

4. 迴文结构 (Palindromes)

DNA 的非编码区的一级结构的研究表明，在 DNA 的非编码区往往存在一种有趣的对

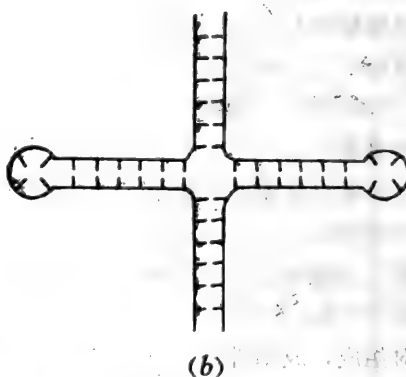
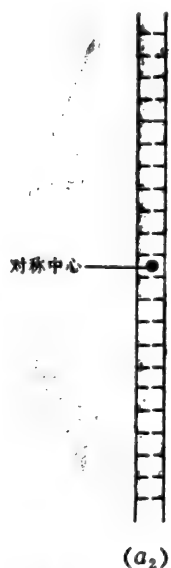
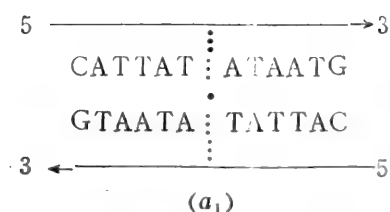


图4—23 (a)：迴文结构(也叫反向重复结构)，表现为在对称中心两侧呈双重旋转对称，
(b)：该迴文结构变性后退火形成了“+”字形结构。

许多迴文结构涉及上千个碱基对。短的迴文结构可以高度重复地出现在真核生物 DNA 分子中。许多 DNA 限制性内切酶的识别部位也具有迴文结构的特征。但是，关于迴文结构在天然 DNA 分子中存在的意义，目前尚不清楚，有待进一步研究。

第五节 RNA 的结构

一、RNA 的类型和一般结构特征

与 DNA 不同，在所有生物细胞中都含有三种不同类型的 RNA，即 mRNA、tRNA 和 rRNA。此外，在细胞内还含有其他种类的 RNA，如不均一核 RNA (HnRNA)、核内小分子 RNA (snRNA) 等等。在线粒体和叶绿体中也含有相应的 RNA。除上述 RNA 外，还有种类很多的病毒 RNA。70 年代以来所发现的类病毒只含有唯一的 RNA。

除病毒 RNA 外，细胞内的各种 RNA 都是以 DNA 为模板合成的。因此，RNA 的碱基组成与 DNA 的碱基组成十分相似。所不同的是，在 RNA 分子中，尿嘧啶代替了胸嘧

嘧啶；此外，在 RNA 分子中，核糖代替了脱氧核糖。RNA 是由 腺苷酸（AMP）、鸟苷酸（GMP）、胞苷酸（CMP）和尿苷酸（UMP）四种 5'-核苷酸组成的。

RNA 分子中还含有相当数量和种类较多的稀有碱基，其中以 tRNA 分子尤为突出。在 DNA 分子中很少有稀有碱基存在。RNA 分子中的这些稀有碱基是在转录后经特异性的修饰酶修饰而产生的。

除某些双股病毒 RNA 外，RNA 都是单股分子，不具有 $A/U = G/C = 1$ 的碱基比例关系。但它可以通过自身回折，在分子内部可以互补的区域形成氢键，从而形成较短的双螺旋结构。互补配对的规则是 A 与 U、G 与 C。不能配对的碱基区域形成突环被排斥在螺旋结构之外。因此，RNA 分子具有特殊的二级结构（图 4—24）。每一个螺旋至少要有 4—6 个碱基对才能保持稳定。不同的 RNA 其双螺旋区所占的比例是不同的。在 tRNA 中占 50% 左右，在 rRNA 中占 40% 左右；在烟草花叶病毒（TMV）RNA 中占 60%。

二、RNA 核苷酸顺序的测定

核酸（无论是 DNA 还是 RNA）结构的研究首先必须测定它的一级结构。只有在研究核酸的一级结构基础上才能进一步研究它的高级结构，以及结构与功能的关系。核酸结构研究的突破，首先是关于 tRNA 一级结构的测定。1965 年，Holley 等人报道了利用片段重叠法测定酵母丙氨酸 tRNA 的一级结构，并利用一级结构提供的信息，提出了 tRNA 三叶草型的二级结构模型。自从 DNA 顺序测定方法获得突破后，RNA 顺序测定的新方法不断涌现，大大推动了 RNA 结构的研究。为了介绍 RNA 核苷酸顺序测定的方法，这里首先介绍在 RNA 结构研究中有关的工具酶。

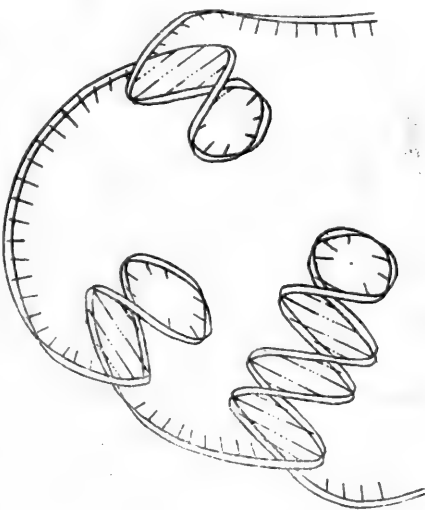


图 4—24 RNA 二级结构示意图

（一）核糖核酸酶类

核酸酶作用的特性可以作为核酸酶分类的基础或依据。根据被作用底物的专一性，可分为脱氧核糖核酸酶（简称 DNA 酶或 DNase）和核糖核酸酶（简称 RNA 酶或 RNase），以及非专一性酶。根据作用方式可分为内切核酸酶（endonucleases）和外切核酸酶（exonucleases）；前者产生寡核苷酸片段，后者产生单核苷酸。有少数酶兼有内切和外切酶的特性。根据磷酸酯键断裂的方式可将核酸酶分为两类，一类是作用于 3'-OH 和磷酸基之间的酯键，产物的 5'-端含有磷酸基；另一类是作用于 5'-OH 和磷酸基之间的酯键，产物的 3'-端含有磷酸基。还有其他一些准则可以用来进一步定义核酸酶。

1. 胰核糖核酸酶（Pancreatic ribonuclease）（EC3.1.4.22）

胰核糖核酸酶简称 RNase A（或 RNase I），是一种存在于胰脏中的、对热十分稳定的内切核酸酶。该酶首先是从牛胰脏中提取出来的，故因此而得名。牛胰核糖核酸酶的结构、

性质以及作用特性研究得十分详细。

RNase A 是一种很小的蛋白质，分子量为13,700。在微酸性溶液中很耐热，但在碱性溶液中很容易失活。该酶的最适 pH 为7.7，最适温度为65℃。

RNase A 的作用专一性比较高。它只作用于 RNA，不作用于 DNA。它的作用部位是 RNA 分子中的嘧啶核苷酸 C_3' 位上的磷酸基与相邻核苷酸 C_5' 位上的 -OH 之间的酯键(图4—25)。它作用的机制与碱作用于 RNA 的机制相似，先形成 2', 3'-环状磷酸中间物，然后这个中间物水解，产生以 3'-嘧啶核苷酸和 3'-嘧啶核苷酸为末端的寡核苷酸片段。

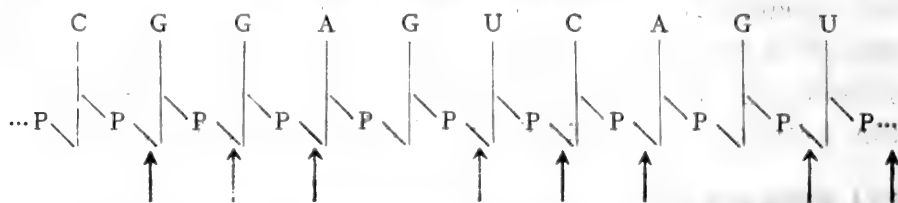


图4—25 RNase A 作用部位(实线箭头指向)和 RNase T_1 作用部位(虚线箭头指向)

RNase A 对嘧啶核苷酸的专一性不是绝对的，因为多聚核苷酸中的腺苷酸 3'-端磷酸基所成的酯键也能被水解，但水解的速度相当低。

2. 核糖核酸酶 T_1 (Ribonuclease T_1)

核糖核酸酶 T_1 (EC3.1.4.8) 简称 RNase T_1 ，是从米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 中分离得到的一种专门水解 RNA 中的鸟苷酸 C_3' 位上的磷酸基与相邻核苷酸 C_5' 位上的 -OH 之间酯键的酶(图4—25)。RNase T_1 也是一种对热、对酸稳定的内切酶。它作用于 RNA 后得到的产物是 3'-鸟苷酸和 3'-鸟苷酸结尾的寡核苷酸片段。此外，RNase T_1 也能水解黄嘌呤、次黄嘌呤、二甲基鸟嘌呤核苷酸等与相邻核苷酸的 5'-OH 之间的酯键。

与 RNase T_1 同一种来源的另一种内切酶是 RNase T_2 。这个酶作用的专一性较差，但水解 3'-腺苷酸与相邻核苷酸 5'-OH 之间的酯键的速度最快。

3. 核糖核酸酶 U_2 (Ribonuclease U_2)

核糖核酸酶 U_2 (简称 RNase U_2) 来自 *U. Sphaerogena* (一种黑粉菌)，是一种对 3'-嘌呤核苷酸与相邻核苷酸 5'-OH 之间的酯键有较高专一性的内切酶，但作用于腺苷酸的速度远远大于作用于鸟苷酸。如果先将 RNA 中的鸟苷酸上的鸟嘌呤用特异性的化学试剂修饰，那么 RNase U_2 不再作用于 RNA 分子中鸟苷酸 3'-端磷酸基所成的酯键，只作用于腺苷酸 3'-端磷酸基所成的酯键。

4. 核糖核酸酶 Phy I

核糖核酸酶 Phy I (简称 RNase Phy I) 是从 *Physarum polycephalum* (多头绒泡菌) 中分离到的一种专一性较弱的内切酶。该酶主要作用尿嘧啶核苷酸 3'-端磷酸基所成的酯键。

此外，从 *Ustilago sphaerogena* 分离到的 RNase U_1 以及从 *Neurospora crassa* 分离到的 RNase N_1 都具有和 RNase T_1 相似的作用特性。

5. 非专一性核酸酶

(1) 小球菌核酸酶 (Micrococcal nuclease) (EC. 3.1.4.7) 是从一种链球菌中分离到的非专一性内切酶，它既可以作用于 RNA，亦可以作用于变性的 DNA，产物均为 3'-核

苷酸和3'-端具磷酸基的寡聚核苷酸片段。

(2) 核酸酶 S_1 (Nuclease S_1)

核酸酶 S_1 是从 *Aspergillus oryzae* 中分离到的一种非专一性的核酸内切酶。该酶能水解 RNA 和单链 DNA, 其产物是5'-核苷酸和5'-端具磷酸基的寡聚核苷酸片段。

(3) 核酸酶 P_1 (Nuclease P_1)

核酸酶 P_1 是从桔青霉 (*Penicillium citrium*) 中分离到的一种非专一性内切酶。该酶不仅能水解 RNA, 而且也能水解 DNA; 而且该酶还具有3'-磷酸单酯酶的活性, 即能从核苷酸或寡核苷酸片段的3'-端水解除去磷酸基。

(二) RNA 核苷酸顺序测定

近年来, 测定 RNA 核苷酸顺序的新方法有了很大的发展。这些方法可以说是在测定 DNA 核苷酸顺序的“加”“减”法和化学裂解法的推动或启发下建立起来的。这里仅就原始的片段重叠法和特异性核酸酶降解直读法作原理上的介绍。

1. 片段重叠法

Holley 等人采用了类似 Sanger 测定胰岛素一级结构的方法, 分析了酵母丙氨酸 tRNA 的一级结构。这个方法就是所谓片段重叠法, 其原理是: 利用不同 RNase 作用的专一性, 将 RNA 降解成大小不同的两套或几套小碎片, 然后分别分离出来, 并测定每个小碎片的碱基组成和核苷酸顺序。不同专一性的酶降解得到的片段是相重叠的。根据重叠区的核苷酸顺序就可以确知这些小碎片在 RNA 中的前后位置, 进而可以确定整个 RNA 分子的核苷酸顺序。

小片段的核苷酸顺序测定可采用高碘酸氧化法等方法进行。高碘酸氧化法是首先用高碘酸氧化 RNA 片段 C_3 端邻近的羟基, 然后在弱碱性条件下进行 β 消除反应, 测定 β 消除反应产生的碱基, 即可确定3'-端的第一个核苷酸。小片段新的3'-端的磷酸基经3'-磷酸单酯酶处理除去后可进行第二次循环。如此下去即可测定小片段的核苷酸顺序。

在片段重叠法中最常用的专一性核糖核酸酶是 RNase A 和 RNase T_1 。这两种酶作用的专一性已如前述。现有一假想的 RNA 片段, 该片段用 RNase A 和 T_1 分别作用后可产生如下的信息:

用 RNase A 处理得: C、U、G、AGAU

用 RNase T_1 处理得: AUG、CUAG

根据这两组碎片的核苷酸顺序的重叠情况即可以确定该片段的核苷酸顺序是 CUAGAUG, 而不可能是 AUGCUAG。

2. 特异性核酸酶降解直读法

特异性核酸酶降解直读法测定 RNA 核苷酸顺序的基本原理是, 用几种专一性不同的核糖核酸酶分别对一端 (通常是5'-端) 用 ^{32}P 标记的 RNA 进行部分降解, 即可以分别获得一组一端有标记的, 另一端以特异碱基为末端的长度不等的酶解产物。然后利用聚丙烯酰胺平板电泳技术, 将上述几组酶解产物连同用碱或甲酰胺非特异性部分降解而获得的“阶梯”式产物在同一凝胶板上电泳分离, 从放射性自显影的胶片上, 结合非特异性部分降解的“阶梯”式谱带, 即可直接按顺序读出 RNA 的核苷酸顺序。一般一次可以直接读出100—200个核苷酸的顺序。

常用的碱基特异性的核糖核酸酶有 RNase T₁ (专一于 G)、RNase A (专一于 U 和 C)、RNase U₂ (专一于 A 和 G, 但作用于 A 的速度远远大于 G)、RNase Phy I (主要作用于 U) 以及其他一些核糖核酸酶。若能找到专一性更强的 RNase, 那么该法解读 RNA 顺序的能力就会大大增加。

如果 RNA 分子中存在着强的二级碱基配对, 则酶对这种区域就不起作用, 即使在变性 (7mol/L 尿素) 或 50℃ 加热的条件下也是如此。因此, 在这种情况下放射性自显影图谱中会造成一些谱带的缺失。后来有人提出, 可以在专一性降解 RNA 之前先用甲氧胺-亚硫酸氢盐混合物 (Methoxyamine-bisulfite mixture) 处理 RNA, 对胞嘧啶核苷酸进行修饰, 使其带上 -SO₃ 基团。由此破坏了 G—C 间的氢键, 使 RNA 的二级结构解开, 这有利于随后进行酶的降解。但是, 被修饰的胞嘧啶核苷酸和它们 3' 端邻近的核苷酸之间的磷酸酯键对 RNase A 有抗性, 因而不能测定出胞嘧啶核苷酸在 RNA 核苷酸顺序中的位置, 即缺乏以修饰的胞嘧啶核苷酸结尾的部分水解产物。这可以通过与未修饰的 RNA 的酶降解产物进行比较而得到解决。这不仅能获得比纯粹的酶法更多的谱带, 而且可以区分 U 和 C。

图4—26表示了一个假想 RNA 片段用上述方法测定核苷酸顺序的结果。从放射性自显影图谱上直接读出该片段的核苷酸顺序为:

5'-₃₂P AUGGACUACG-3'

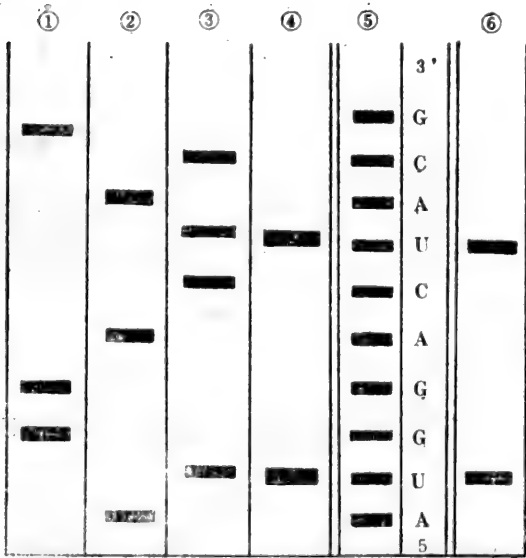


图4—26 特异性核酸酶降解直读法可从放射性自显影胶片上读出 RNA 的核苷酸顺序。

①②③④表示 RNA 化学修饰前用 RNase 降解的结果。其中①为用 RNase T₁, ②用 RNase U₂, ③用 RNase A, ④用 RNase Phy I, ⑤表示非特异性降解产生的“阶梯”式谱带 (主要起对照检出缺乏核苷酸的位置); ⑥表示 RNA 经化学修饰后用 RNase A 降解的结果。

三、tRNA 的结构

tRNA 以游离状态存在于细胞质中, 约占细胞总 RNA 的 15%。tRNA 的主要功能是把氨基酸转运到与核糖体结合的 mRNA 上。因此, tRNA 是一种能结合特定氨基酸并能识别 mRNA 分子中的该氨基酸的密码子、将特定氨基酸转运到正在合成的蛋白质多肽链中去的

接合体分子。tRNA 的种类很多，约有50多种。每一种 tRNA 都能专一于某种 氨基酸 及其密码子。有些氨基酸可有几个密码子编码，因而就有几种 tRNA 专一于某种特定的氨基酸。但由于 tRNA 上反密码子的摆动性（见“蛋白质生物合成”一章），一种 tRNA 可以识别同一氨基酸的不同密码子。因此，各种 tRNA 的总数并不等于氨基酸密码子的总数。

1. tRNA 的二级结构

Holley 完成了酵母丙氨酸 tRNA（简作 tRNA^{Ala}）的一级结构测定之后，根据 tRNA^{Ala} 的一级结构以及碱基配对的规则，提出了 tRNA 二级结构的模型。该模型类似三叶草，故称为三叶草二级结构(图 2—27)。它们一般由75—90个核苷酸组成，含有较多的稀有碱基。在不同的 tRNA 分子中，约有21个核苷酸是不变或半不变的。绝大多数 tRNA 的二级结构都符合三叶草形结构。图4—28展示了 tRNA 结构通式。tRNA 的二级结构具有下列特征。

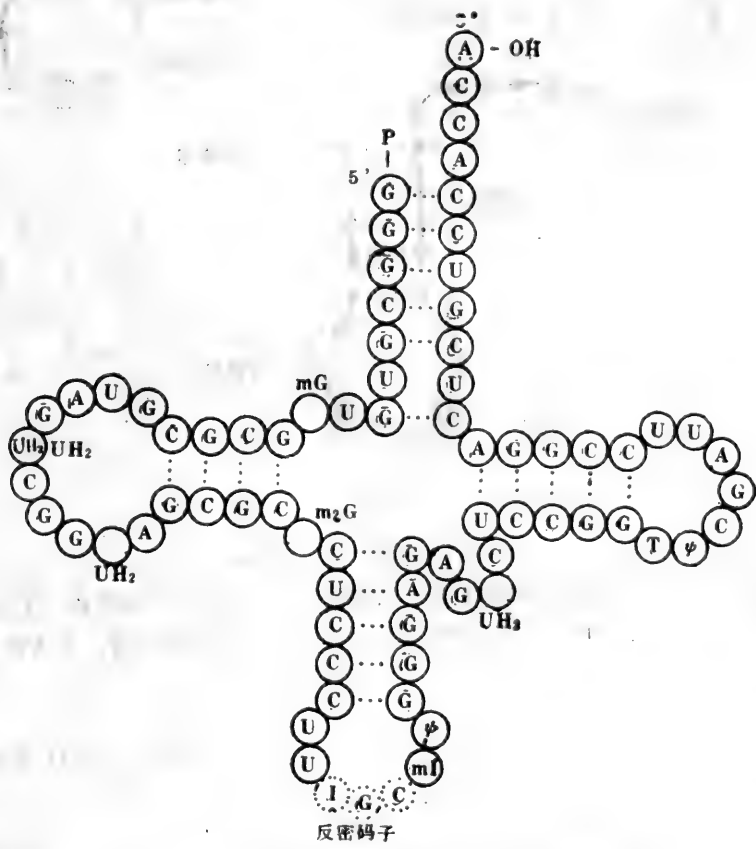


图4—27 酵母丙氨酸 tRNA 的三叶草形二级结构

- ①tRNA 的多核苷酸链分子内形成氢键的碱基对都是 A 与 U、G 与 C。形成氢键的部位称作臂 (arm)。不能形成氢键的区段形成环状突起，这种突起则称环 (loop)。臂的长短及环中的核苷酸数，在不同的 tRNA 分子中只有很小的差别。
- ②在这个模型中，tRNA 的5'-端和3'-端附近的碱基互补配对，形成所谓氨基酸臂。在

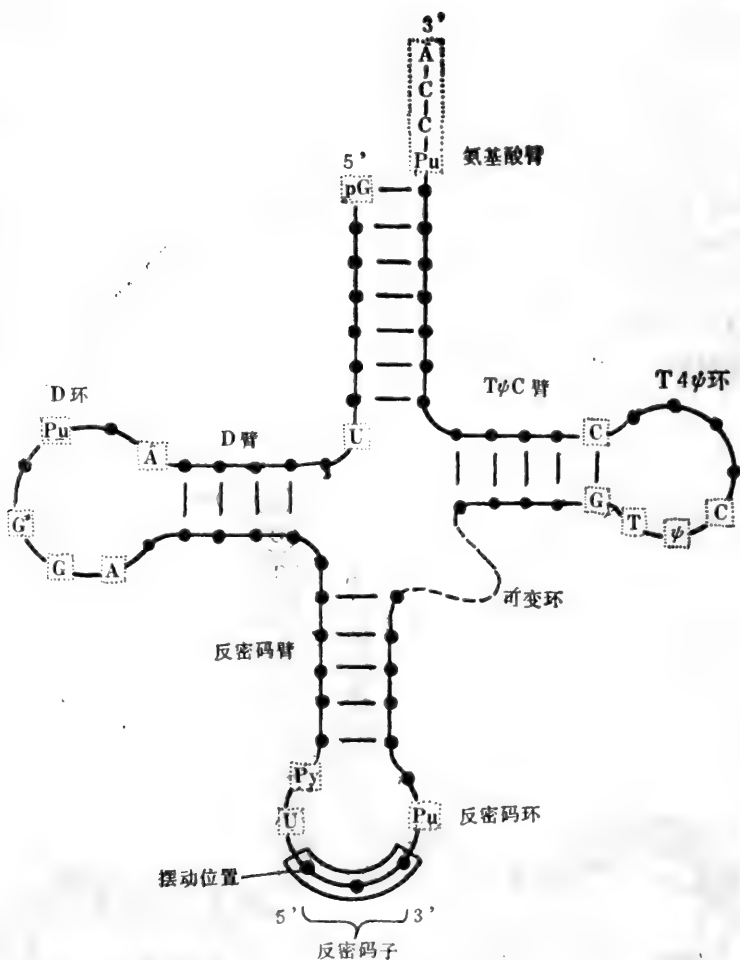


图4—28 tRNA 的二级结构

字母标明的是不变或半不变的核苷(或碱基), 其中 Pu 为嘌呤核苷, Py 为嘧啶核苷, ψ 为假尿嘧啶核苷, G* 为鸟嘌呤核苷或2'-O-甲基鸟嘌呤核苷, T 为胸嘧啶核糖核苷

3'-端都有一段 -pCpCpA-OH 结构, 不参与配对, 氨基酸就连接在 AMP 核糖上的 2'-OH 或3'-OH 上。

③氨基酸臂对面是反密码臂, 由五个碱基对组成。它的顶端是反密码环, 由七个碱基组成, 其中三个碱基代表某种氨基酸的反密码子(anticodon), 刚好与该氨基酸的密码相对应。例如苯丙氨酸的 tRNA 的反密码子是 5'-GAA-3', 相应的密码子是 5'-UUC-3' (图4—29)。反密码环的大小(七个核苷酸)是恒定的。这可能与正确地识读密码子有关。

④在三叶草形结构的左侧有一个大突环, 由 8—12核苷酸组成。由于含有二氢尿嘧啶(Dihydrouracil), 故称为二氢尿嘧啶环或 D-环。D-环由 D 臂与其他部分相连。

⑤在三叶草形结构的右侧有一个由七个核苷酸组成的突环。在这个突环中有一段 TψC

结构，因此该突环称为 T ψ C 环。该环与核糖体的结合有关，因为 5S rRNA 含有与它互补一段核苷酸顺序。T ψ C 环由 T ψ C 臂与其他部分相连。

⑥在反密码臂和 T ψ C 臂之间有一个可变环。在不同的 tRNA 中，这个环的大小是不同的。

2. tRNA 的三级结构

Kim 等人和 Robertus 等人几乎在同时期用 X-射线晶体衍射法证明酵母苯丙氨酸的 tRNA (tRNA^{Ph^o}) 具有倒 L-形的三级结构。在这种倒 L-形结构中，氨基酸臂和 T ψ C 臂形成一个连续的双螺旋区，D-臂和反密码臂也形成一个近似连续的双螺旋区。3'-端位于倒 L-形的一端，反密码区则位于倒 L-形的另一端，两端之间相距 70 Å。T ψ C 环和 D-环形成倒 L-形分子的拐角。因此，二级结构中所假定的三叶草形在三级结构中

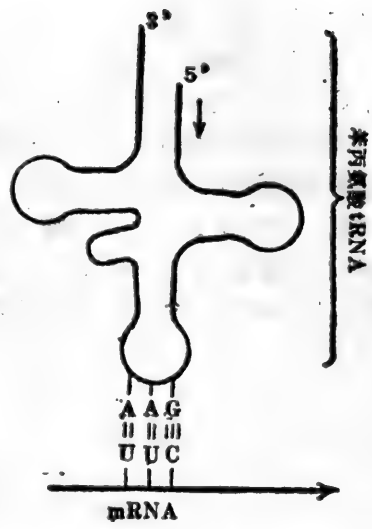


图4—29 密码子与反密码子互补配对

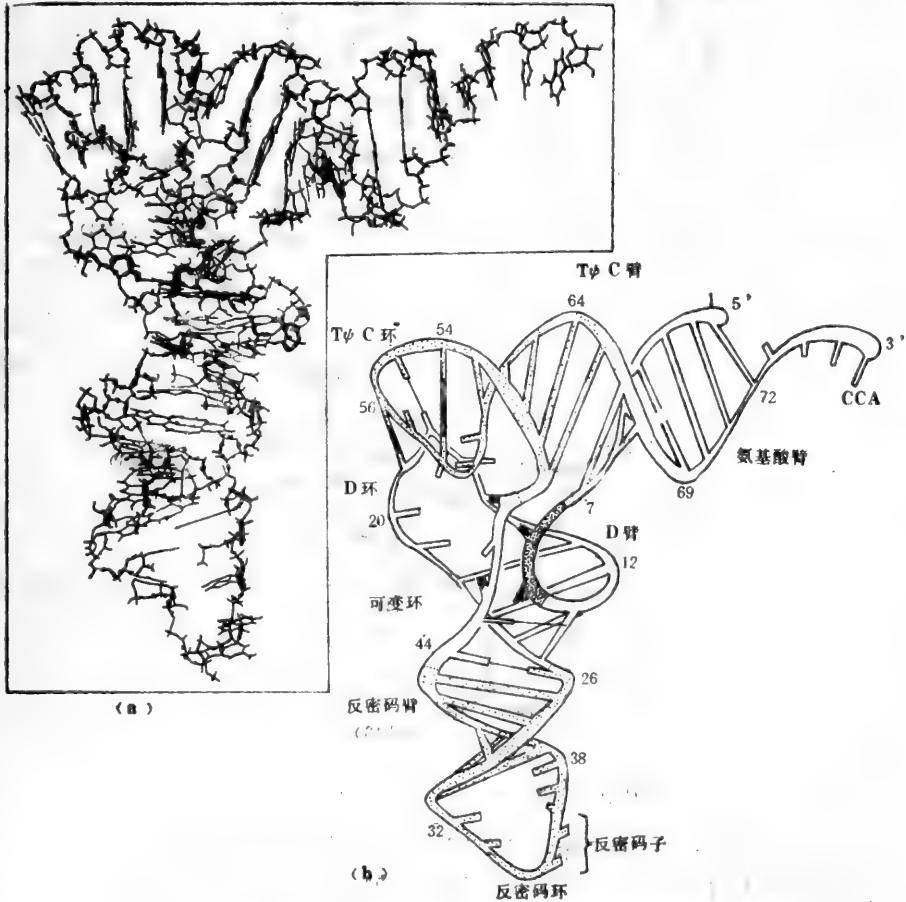


图4—30 酵母苯丙氨酸 tRNA 的倒 L-形三级结构模型 (a): 结构模型照片; (b): 模型解释图。

是存在的 (图4—30)。

在倒 L-形的三级结构中,发现了一些有趣的氢键。RNA 分子的碱基配对 规则是 A 与 U、G 与 C,但在 tRNA 的倒 L-形结构中发现了所谓三级氢键 (即在 tRNA 的三级结构中才出现的配对方式)。例如在酵母苯丙氨酸 tRNA 的三级结构中,58 位的 1-甲基腺嘌呤与 54 位的胸嘧啶配对 (图4—31(B)) ;此外,还有某一个碱基同时 与另外 两个碱基形成氢键 的情况,例如,22 位的鸟嘌呤 (G) 同 13 位的胞嘧啶 (C) 以及 同 46 位的 7-甲基鸟嘌呤 (m^7G) 同时形成氢键 (图4—31(C))。大多数三级氢键的形成与那些不变或半 不变 核苷酸有关。因此,认为那些不变或半不变核苷酸对于三级结构的形成与稳定有密切的关系。

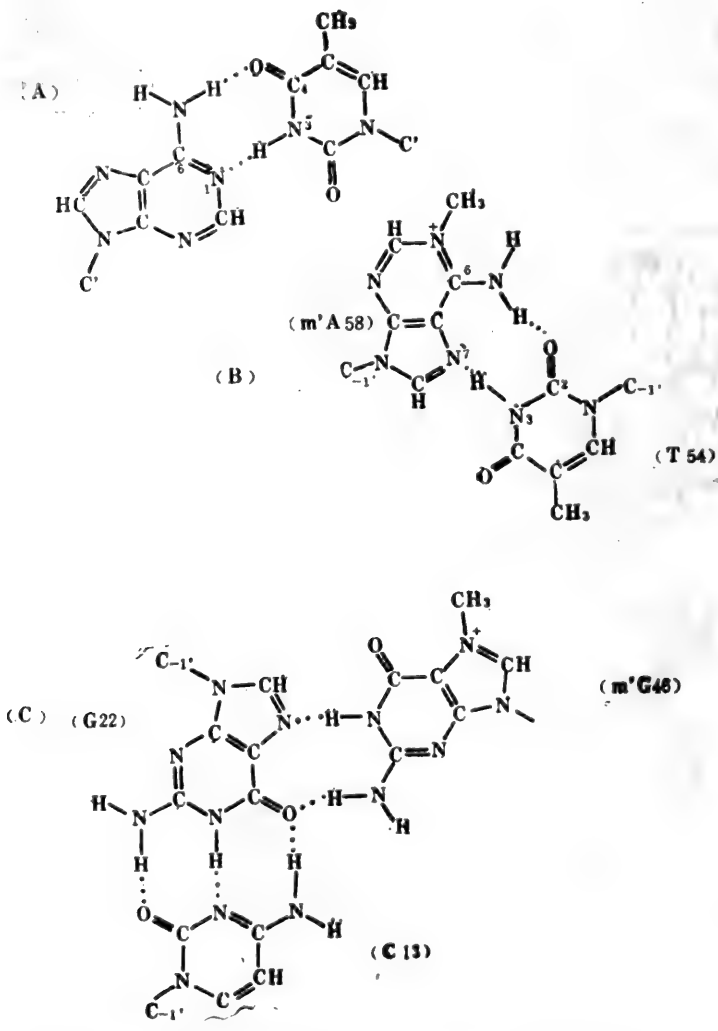


图4—31 酵母苯丙氨酸 tRNA 三级结构中的特殊氢键。

(A) RNA中 A 与 T 的正常配对, (B) tRNA^{phe} 中 m^1A 与 T 的非标准配对, (C) tRNA^{phe} 中 G₂₂ 与 C₁₃ 和 m^7G_{46} 之间的非标准配对。

一般认为，不同来源的 tRNA 似乎基本上都具有类似倒 L-形的三级结构。这种结构上的相似性与其功能上的相似性看来是一致的，因为不同的 tRNA 必须能与同一个 mRNA 在同一个核糖体上相互作用。据认为，氨酰基-tRNA 合成酶是结合在倒 L-形的侧面上的。

近年来，有人从牛心线粒体和人线粒体中发现了两种结构特殊的 tRNA^{ser}，其沉降系数只有 3S (tRNA 通常为 4S)。它们的二级结构完全失去了 D-臂和 D-环。据认为这两种 tRNA^{ser} 也能形成倒 L-形的三级结构。

四、mRNA 结构的某些特征

mRNA 存在于细胞质中。正象它的名称表明的那样，是作为基因的细胞质信使，携带着合成蛋白质多肽链的信息。mRNA 约占细胞 RNA 总量的 5 %。它的碱基组成与转录它的 DNA 的碱基组成十分相当，也很少出现稀有碱基。这与它作为基因遗传信息的传递者的功能是一致的。

细菌 mRNA 在代谢上很不稳定，在蛋白质合成之后很快就被降解。细菌 mRNA 的半衰期一般只有几分钟。真核细胞的 mRNA 半衰期较长。

从目前已经研究过的各种 mRNA (包括病毒 RNA) 的一级结构，初步发现了 mRNA 结构上的某些特征。

1. 非翻译区

现已发现，无论是原核生物还是真生物的 mRNA 都存在非翻译区。翻译区含有合成蛋白质的信息，非翻译区不含指令蛋白质氨基酸顺序的信息。非翻译区的长短随不同的 mRNA

表4-11 某些原核生物 mRNA 起始部位的核苷酸顺序

mRNA	起始密码子 AUG 或 GUG 前面的一段富含嘌呤碱基的顺序
大肠杆菌:	
Lac Z	5'AAUUUCACACAGGAAACAGCUAUG.....
Lac IAGUCAAUUCAGGGUGGUGAAUAUG.....
gal EAUAAGCCUAAUGGAGCGAAUUAUG.....
gal TUAUCCCGAUUAAGGAACGACCAUG.....
trp AGAAAGCACGAGGGGAAAUCUGAUG.....
trp EGAACAAAAUUAGAGAAUAACAAUG.....
噬菌体 MS ₂ :	
A 蛋白GAUUCCUAGGAGGUUUGACCUGUG.....
外壳蛋白CCUCAACCGGAGUUUGAAGCAUG.....
复制酶AAACAUGAGGAUUACCCAUG.....
噬菌体: ϕ X174	
A 蛋白AAAUCUUGGAGGCUUUUUUAUG.....
B 蛋白UAAAGGUCUAAGGAGCUAAAGAAUG.....
C 蛋白GAAGUGGACUGCUGGCGGAAAAAUG.....
D 蛋白ACCACUAAUAGGUAAGAAAUCAUG.....

而异。在 mRNA 的 5'-端、3'-端以及原核生物的多顺反子 (polycistronic) mRNA (即携带一种以上蛋白质合成信息的 mRNA) 中的顺反子^{*} (cistron) 之间都存在非翻译区。在翻译区内尚无非翻译区插入的证据。

mRNA 5'-端起始密码子 (AUG 或 GUG) 之前的非翻译区称为前导顺序 (Leading sequence)。比较了原核生物各种 mRNA 的前导顺序后, 发现在距离起始密码子约10个核苷酸处有一段富含嘌呤核苷酸的区域(表4—11)。例如, 在乳糖操纵子的 Z 蛋白、MS₂ 的 A 蛋白以及噬菌体 ϕ X174 的 A 蛋白的顺反子处, 富含嘌呤碱基的顺序分别是 AGGAA、AGGAGG 和 GGAGG (见表4-11)。这样的顺序刚好同 16S rRNA 3'-端的一段富含嘧啶的顺序互补, 例如可以同大肠杆菌 16S rRNA 的 3'-端顺序 3'-HO-AUUCCUCCACUAG……中的一段嘧啶顺序互补。这一特征可以将 30S 核糖体亚基结合在邻近 mRNA 起始密码子的特定部位上, 与核糖体结合的甲酰甲硫氨酰 tRNA 因此而容易与起始密码子相互作用, 从而起始蛋白质的合成。这样看来, 前导顺序含有翻译起始的识别部位, 与蛋白质合成起始有关。真核生物 (包括真核生物病毒) mRNA 5'-端起始密码子前的非翻译区的前导顺序中有一段富含嘧啶核苷酸的顺序, 与 18S rRNA 3'-端的一段富含嘌呤核苷酸的顺序可以互补。但是, 有些 mRNA 完全不含有互补的嘧啶核苷酸顺序。因此, 真核生物 mRNA 5'-端前导顺序的这一特征是否与翻译起始有关尚无定论。

真核生物 mRNA 3'-端的非翻译区有一段共同的 AAUAAA 顺序, 这一特征可能与蛋白质合成终止有关, 也可能与 mRNA 的转录终止有关。

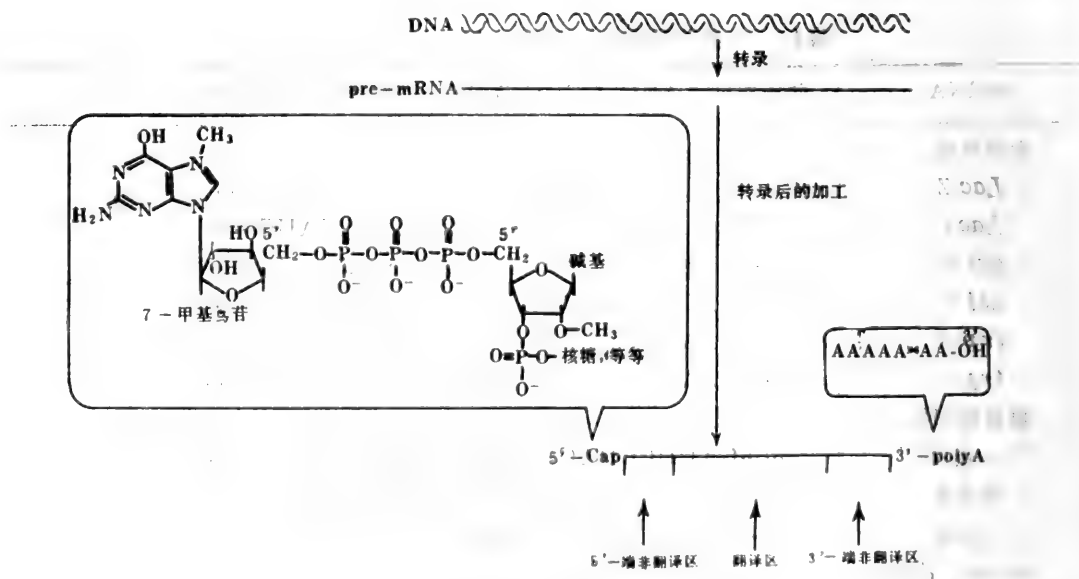


图4-32 真核生物 mRNA 结构示意图

• 顺反子 (cistron)：是由顺反试验所规定的遗传单位，相当于一个基因，含有决定一个蛋白质多肽链氨基酸顺序所需要的全部核苷酸顺序。

2. mRNA 末端的修饰结构

迄今所知,绝大多数成熟的真核生物 mRNA 的末端都含有修饰结构。这是真核生物不同于原核生物 mRNA 的一个显著特点。原核生物 mRNA 的末端没有这样的修饰结构。真核生物的 mRNA 末端修饰结构出现在两个末端,即在 5'-端含有一甲基化的“帽”(cap)结构和在 3'-端有一段多聚腺苷酸 (poly A) 顺序。

(1) 5'-端“帽子”结构

真核生物 mRNA 5'-端含有 7-甲基鸟苷-5'-三磷酸-2'-甲基核苷-3'-磷酸,即 $m^7G(5')pppNmp$ 的结构。这一甲基化的结构称为“帽”结构,位于 5'-端非翻译区的前面,是转录后在细胞核中通过专一性的酶修饰而成的。7-甲基鸟苷酸通过 5',5'-磷酸酯键同原有 5'-端核苷酸的焦磷酸相连(见图4-32)。目前认为这种帽子结构可以增强对外切核酸酶的抗性,从而保护 mRNA 的翻译活性。此外,还认为帽子结构与蛋白质合成起始有关,也许是为核糖体提供一个识别部位。

(2) 3'-端多聚腺苷酸结构

目前认为大多数真核生物的 mRNA 在 3'-端都含有一段多聚腺苷酸 (Polyadenylic acid, 简称 poly A) 的尾链,其平均长度约为 200 个腺苷酸。这段 poly A 结构并不是从 DNA 模板上转录来的,而是在转录之后逐个加上去的(图4-32)。有人认为这种 poly A 结构与 mRNA 从细胞核转移到细胞质中去有关,亦有实验证明 poly A 的存在增加了细胞质 mRNA 的稳定性。

由于真核生物 mRNA 具有 poly A 这种特殊结构,因此,人们设计了一种十分巧妙的方法能把真核生物 mRNA 从细胞提取液中分离出来。在一个惰性支持物上采用化学的方法把寡聚 dT (脱氧胸苷酸)接上去,装在柱中,然后把提取液上柱,控制一定的条件,把 mRNA 挂在上边。改变洗脱条件,即可把 mRNA 洗脱下来,从而得到纯净的样品。上述方法是一种亲和层析法。

五、rRNA 的结构

rRNA 约占细胞 RNA 总量的 80%,它是细胞质核糖体的组分,与核糖体蛋白质一起构成核糖体。核糖体是蛋白质合成的场所,由大小两个亚基组成。在细菌细胞中,核糖体小亚基为 30S,其中含有一种 16S rRNA;核糖体大亚基为 50S,其中含有 5S 和 23S 两种 rRNA。在真核生物中,核糖体小亚基为 40S,其中含有一种 18S rRNA;核糖体大亚基为 60S,其中含有 5S、5.8S 和 28S 三种 rRNA。由于蛋白质的合成是在核糖体上进行的, mRNA、tRNA 以及与蛋白质合成有关的酶和蛋白质因子之间的相互关系都会在核糖体上表现出来。所以, rRNA 结构的研究有助于蛋白质生物合成机制的阐明。在上述各种不同的 rRNA 中,以细菌(特别是大肠杆菌)的 rRNA 研究得较为深入。

大肠杆菌 5S rRNA 的核苷酸顺序是 1967 年测定的,它是由 120 个核苷酸组成的,不含稀有碱基,是 5S rRNA 基因转录的忠实产物。比较了不同细菌的 5S rRNA 的核苷酸顺序,表明一级结构有一定程度的守恒。例如在 40—50 核苷酸之间有一段 5'-CGAAC-3' 顺序。这一段顺序刚好同 tRNA 的 T ψ C 环上的 5'-GT ψ CG-3' 顺序互补,因此该顺序与 tRNA 同核糖体的结合有关。另外, 72—83 核苷酸之间有一段核苷酸顺序与 23S rRNA 在大亚基(50S)

中的结合有关。

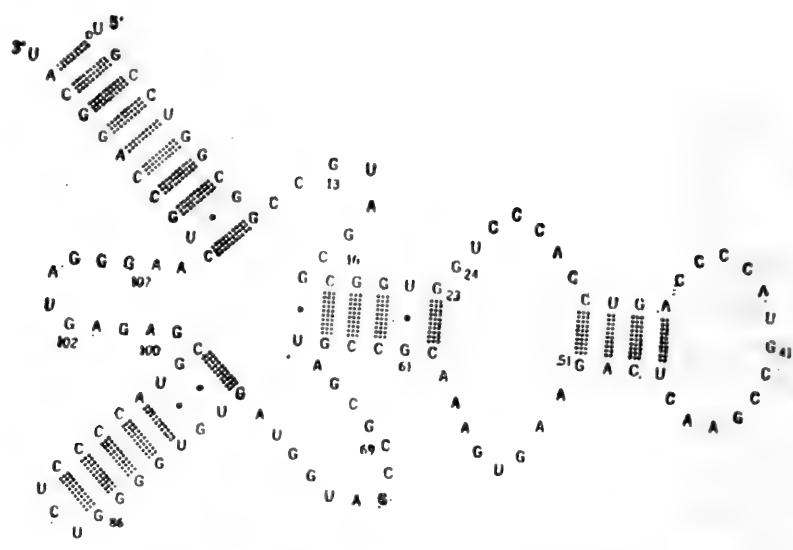


图4-33 大肠杆菌 5S rRNA 的二级结构模型

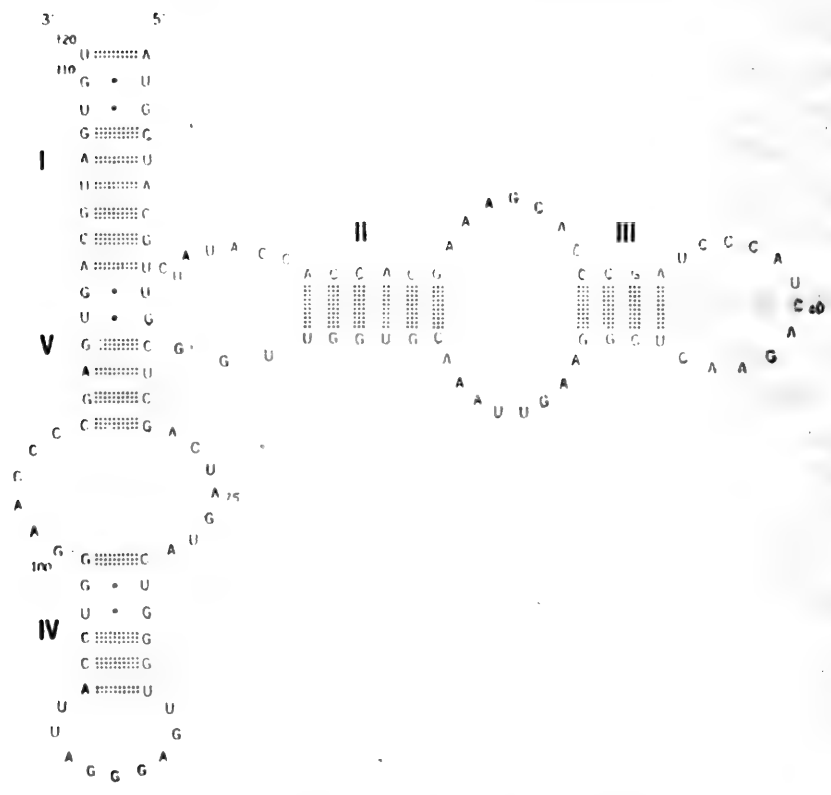


图4-34 小球藻 5S rRNA 的二级结构

根据大肠杆菌 5S rRNA 的核苷酸顺序并结合其它研究结构的方法，于1975年推导出了符合大多数 5S rRNA 的二级结构的模型（图4-33）。虽然，在已研究过的不同细菌的 5S rRNA 的两个末端附近的核苷酸顺序不同，但 5'-端和 3'-端都能互补形成双股区。

真核生物 5S rRNA 的二级结构与原核生物 5S rRNA 的二级结构基本相似（图4-34）。真核生物的 5.8S rRNA 通常含有 160 个左右的核苷酸，分子中含有修饰碱基。5.8S rRNA 具有类似于细菌 5S rRNA 的功能，因为在 5.8S rRNA 中也存在与 5'-GT ψ CG-3' 顺序互补的 5'-CGAAC-3' 顺序。有人认为 5.8S rRNA 的二级结构可能与 5S rRNA 的相似。

一些细菌的 16S rRNA 的核苷酸顺序已被测定。大肠杆菌 16S rRNA 由 1542 个核苷酸组成。在此基础上提出的二级结构模型如图 4-35 所示。从图我们可以看出，几乎近一半的碱基

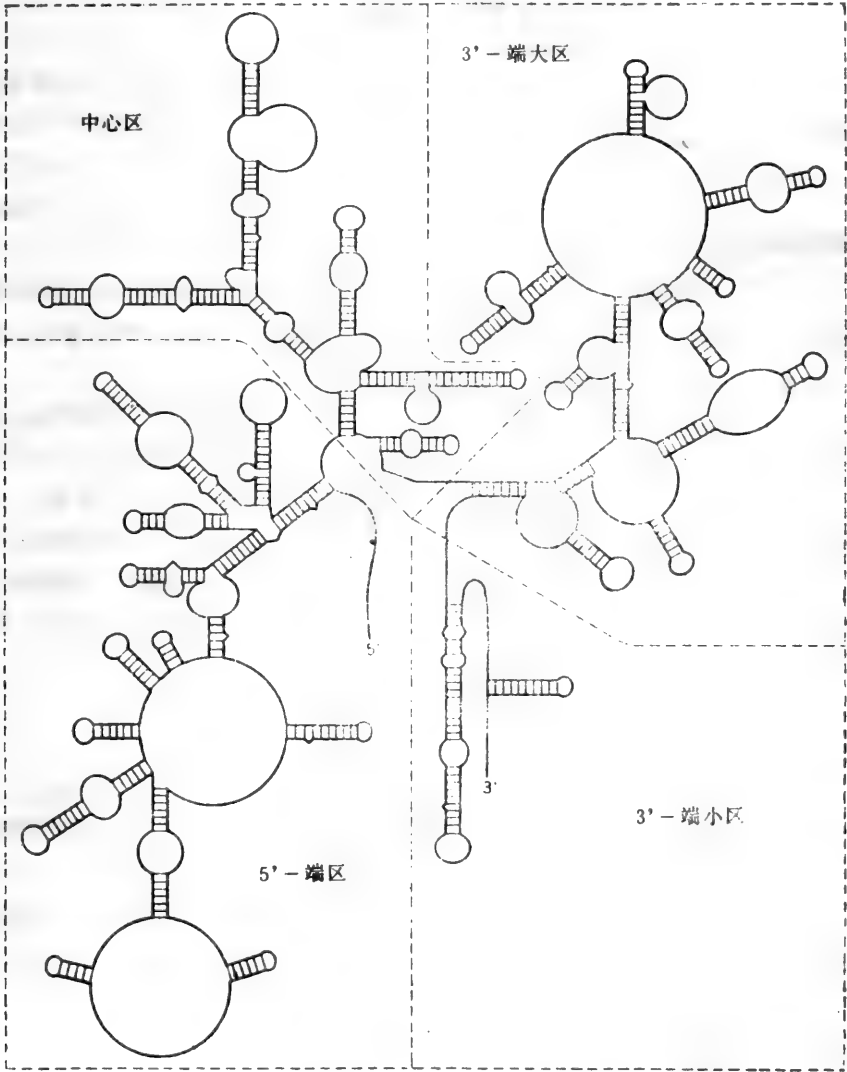


图4-35 大肠杆菌 16S rRNA 的二级结构

参与了碱基对的形成，单个双螺旋区是比较短的，最长的螺旋也只有8个碱基对。分子的整体结构可分为相对独立的四个区（见图4-35）。

在16S rRNA的3'-端附近含有一段与mRNA前导顺序互补的富含嘧啶的结构，与mRNA同30S亚基的结合即翻译起始有关。另外，在16S rRNA的3'-端区域亦含有与23S rRNA 3'-端一段核苷酸互补的顺序，这可能在30S亚基与50S亚基的结合中起作用。

大肠杆菌23S rRNA的核苷酸顺序已被测定，是由2904个核苷酸组成。在靠近5'-端的附近有一段可以同5S rRNA上的72—83核苷酸互补的顺序。同样，在23 rRNA的3'-端区也含有与16S rRNA的3'-端区互补的一段核苷酸顺序。虽然已经为23S rRNA的二级结构提出了几种模型，但仍处在不断研究之中。

第六节 核酸的性质

核酸的性质是与其分子的组成及结构密切相关的。研究核酸的许多方法都是在认识了核酸各种性质的基础上建立和发展起来的。要研究核酸结构与功能之间的关系也必须首先认识核酸的一些重要的性质。

一、核酸的溶解性质

DNA和RNA都是由核苷酸组成的大分子。它们含有许多极性基团，例如羟基、磷酸基等。因此，DNA和RNA都能溶解在水溶液中，而不溶于乙醇、氯仿等有机溶剂中，利用核酸的这种性质可以用乙醇把核酸从水溶液中沉淀下来。

在细胞内，DNA和RNA通常都与蛋白质结合在一起，成为DNA-蛋白质（简作DNP）、RNA-蛋白质（简作RNP）复合体。它们的溶解度受到溶液中的盐浓度的影响。DNP在低浓度的盐溶液中，例如在0.14mol/L的氯化钠溶液中溶解度最低，仅为水中溶解度的1%，几乎不溶解，但RNP却能溶解。随着盐浓度的升高，DNP的溶解度不断增高。在1mol/L的氯化钠溶液中，DNP可以完全溶解。利用DNP和RNP在盐溶液中溶解度的差别，可以从生物材料中分别将DNP和RNP提取出来，然后分别除去蛋白质，即可以得到DNA和RNA。

二、核酸的带电性质

如前所述，组成核酸的核苷酸是两性电解质，因而核酸也是两性电解质。在一定的pH条件下，核酸上的可解离的磷酸基和碱基依照各自的解离常数解离，从而使核酸带上电荷，具有电泳行为。由于磷酸基是一种较强的电解质，所以核酸具有较强的酸性，在生理pH下带负电荷。在细胞内，双螺旋DNA分子中的带负电荷的磷酸基团同介质中的阳离子或阳离子化合物结合，抵消了带负电荷的磷酸基团之间的斥力，成为DNA双螺旋结构稳定的因素之一。

由于碱基的解离受pH值的影响，而碱基的解离又会影响到碱基对间的氢键的稳定性。所以，pH值直接影响核酸双螺旋结构中碱基对之间的氢键的稳定性。对DNA来说，碱基对在pH4—11之间是稳定的，超过这个范围DNA就会变性。

三、核酸的旋光性

核酸分子高度不对称,因此核酸有强烈的正向旋光。特别是 DNA 分子,它的比旋度 $[\alpha]_D = +150^\circ$,比组成它的单核苷酸的比旋度大得多。当 DNA 分子变性时,由于分子的不对称性降低,因而变性后的 DNA 其比旋度也大大降低。

四、核酸的粘度

天然 DNA 溶液具有很高的粘度(Viscosity)。但是当 DNA 变性时,其粘度急剧下降。因为,根据大分子溶液的粘度特征,即高分子溶液比普通溶液的粘度要大得多,无规线团分子比球状分子的粘度大,而线性分子的粘度又比无规线团的粘度大。当 DNA 在溶液中处于天然状态时,由于双螺旋的刚性以及长长的线性结构,所以天然 DNA 的粘度很大,即使很稀的溶液其粘度也很大。DNA 变性后,由于双螺旋刚性的失去,氢键断开,两条链彼此分开,单链分子便处于随机卷曲的状态,因而粘度也就急剧下降。因此, DNA 粘度的改变可以作为 DNA 分子变性的重要指标。RNA 分子的粘度要比 DNA 小得多,这与 RNA 的局部双螺旋结构有关。

五、核酸分子的大小

1. RNA 分子的大小

细胞内的 RNA 由于种类不同,其分子量的大小也不相同。mRNA 的分子量一般为 0.5×10^6 左右; tRNA 的分子量大约为 25,000—30,000; rRNA 根据物种的不同又有区别(表4-12)。

病毒 RNA 分子根据种类不同,其分子量也是不同的。例如,烟草花叶病毒的 RNA 分子量为 2×10^6 ; 噬菌体 MS₂RNA 的分子量为 1.1×10^6 。

表4-12 细胞内 rRNA 的分子量

核糖体	来源	小亚基中的 rRNA		大亚基中的 rRNA	
		沉降系数	分子量	沉降系数	分子量
70S	原核生物	16S	0.55×10^6	5S	40000
				23S	1.1×10^6
80S	真核生物	18S	0.75×10^6	5S	40,000
				5.8S	48,000
				28S	1.75×10^6

2. DNA 分子的大小

DNA 分子一般比 RNA 分子大得多。根据不同来源,分子量的差别很大。例如 T₂ 和 T₄ 噬菌体 DNA 的分子量约为 1.2×10^8 ,约含有 182,000 个碱基对。原核生物染色体是单一的一条 DNA。大肠杆菌染色体 DNA 的分子量约为 2.6×10^9 ,含有约 400 万个碱基对,外形长度约为 1400 微米(1.4 毫米)。果蝇染色体 DNA 分子量约为 8×10^{10} ,差不多是大肠杆菌染色体 DNA 的 30 倍。人体细胞以及许多哺乳动物含有比大肠杆菌多 600 倍的 DNA。

在单个人体细胞中,全部染色体(总共有 46 条染色体)DNA 的总长度约为 2 米,而大

肠杆菌 DNA 只有1.4毫米。成年人大约有 10^{13} 个细胞，人体所有 DNA 的总长度 应有 2×10^{13} 米，等于 2×10^{10} 公里，而地球圆周只有四万公里，地球和太阳的距离大约也只有 1.44×10^8 公里，可见真核生物染色体 DNA 之大。

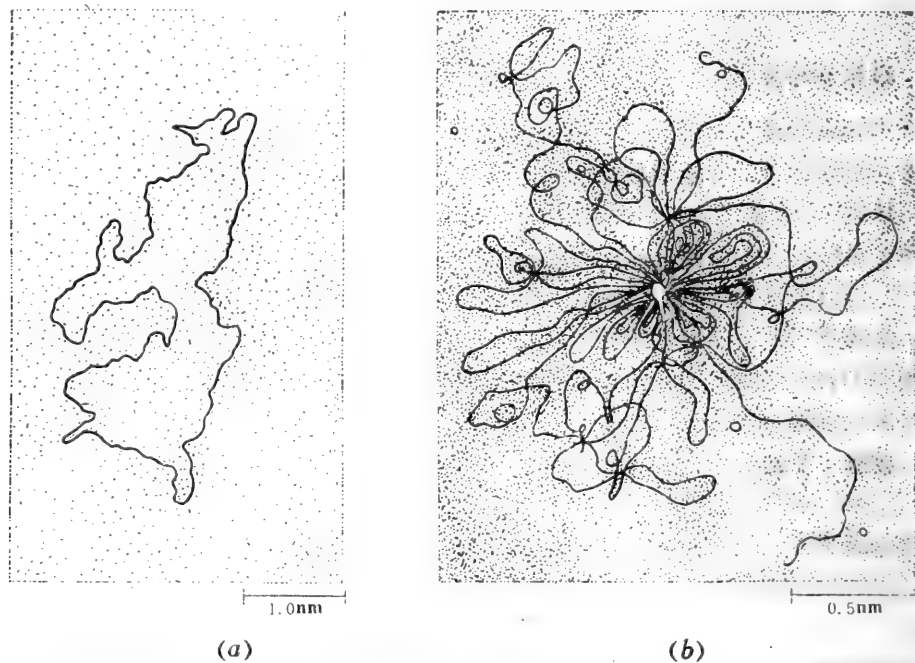


图4-36 两种噬菌体 DNA 的电子显微镜照片（复制品）(a)为 λ DNA，其外形长度为 $17.2\mu\text{m}$ ，分子量为 3.2×10^7 ；(b)为 T_2 噬菌体被它的单一的线性 DNA 分子 包围的照片。

真核生物细胞染色体数随不同种类而不同。现在已经确切知道真核细胞内的每一条染色体含有一条单一的、很大的双螺旋 DNA 分子，它的长度是大肠杆菌的4—100倍。例如，较小的人体染色体之一的 DNA 的外形长度约为30毫米，大约是大肠杆菌 DNA 外形长度的15倍。真核细胞染色体 DNA 是线性的、非环状的。每一条染色体携带一套独特的基因，一个细胞的全部基因构成一个基因组(Genome)。

DNA 的长度，碱基对数（即核苷酸对数）和分子量之间有如下的关系。

一对核苷酸的分子量平均为630；

核苷酸对之间的轴距为 0.34nm (3.4 \AA)；

DNA 的分子量 = 核苷酸对的平均分子量 \times 核苷酸对的数目；

DNA 的长度 = 核苷酸对之间的轴距 \times 核苷酸对的数目；

$$\text{核苷酸对的数目} = \frac{\text{DNA的分子量}}{\text{核苷酸对的平均分子量}}$$

DNA 分子的长度和它的分子量之间还有 这样的关系，即 $1\mu\text{m}$ (微米) = 2×10^6 道尔顿。

从上面的介绍中，我们可以看到 DNA 分子是如此之大，而且高度不对称，因而很容易受到机械剪力(Shearing force)的攻击，降解成分子小1000倍的片段。很小心地 操作才能

获得完整的较大病毒 DNA 分子。

六、核酸的紫外吸收特性

所有的核酸和核苷酸类物质在紫外光区都具有强烈的吸收特性，其最大吸收值在260毫微米(nm)处(图4-37)。这是由于核酸和核苷酸类物质含有嘌呤和嘧啶碱基的缘故。蛋白质因含有酪氨酸和色氨酸，在紫外光区也有吸收特征，但最大吸收在280nm 处。利用核酸和蛋白质紫外吸收的这种差别，可以鉴定核酸制品中的蛋白质杂质。

由于碱基的紫外吸收受溶液 pH 值的影响，因此在测定核酸或核苷酸时应注意在一定的 pH 值下进行。利用核酸或核苷酸的紫外吸收特性，可以对核酸或核苷酸进行定量测定。核苷酸的定性和定量测定已在核苷酸部分进行了介绍。这里仅介绍比消光系数测定核酸的含量。

比消光系数是指一定浓度的核酸(或核苷酸)溶液的消光值。天然 DNA 的比消光系数是0.020(即浓度为1微克/毫升的天然 DNA 溶液在260nm 处的消光值)，RNA 的比消光系数为0.022 (即1微克/毫升的天然 RNA 溶液在260nm 处的消光值)。这样就可以用下面的公式计算出被测样品中的核酸含量。

核酸含量 (μg/ml) = $\frac{\text{甲 } A_{260} - \text{乙 } A_{260}}{0.020(\text{或}0.022)} \times N$

式中：甲 A_{260} 表示一定浓度的被测样品在 260nm 处的消光值；

乙 A_{260} 表示同一浓度的被测样品加入 沉淀剂 沉淀核酸后的上清液在同样波长下的消光值，用作对照；

0.020(或0.022)是 DNA(或 RNA)的比消光系数；

N 表示稀释倍数。

用紫外吸收光谱鉴定 DNA(或 RNA)的纯度是人们常采用的方法，因为这种方法既简便又迅速，它不需要 DNA 或 RNA 变性。合适的光谱是在230—320nm 之间。若在320nm 处的光吸收比在260nm 处的光吸收多百分之几，表明在制品中存在不需要的杂质。如从大肠杆菌细胞中分离质粒 DNA 就很少有这种污染；若从高等生物组织中制备核酸则常有这种污染，并且在320nm 处的光吸收比260nm 处的光吸收高出10%左右。通常双股 DNA 的纯净制品的 $A_{260}:A_{280}$ 的比值应介于1.65和1.85之间。比值过高是由于 RNA 的污染，比值低则是可能是蛋白质或酚的污染造成的。

在核酸变性实验中常引用克原子磷消光系数。克原子磷消光系数是指含磷为 1 克原子浓度的核酸水溶液在260nm 处的消光值，用 $e_{(P)}$ 表示，可用下式计算。

$$e_{(P)} = \frac{A_{260}}{C \cdot L} = \frac{A_{260} \cdot 30.98}{W \cdot L}$$

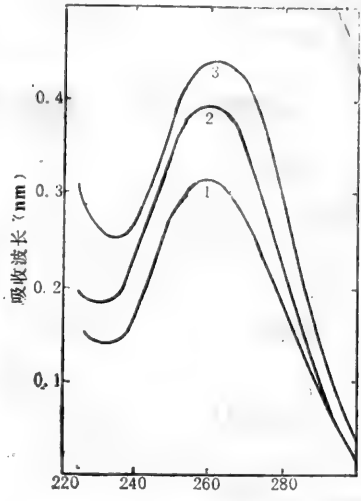


图4-37 DNA 紫外吸收曲线
1.天然 DNA 2.变性 DNA
3.核苷酸单体的总吸收

式中: A 为被测核酸样品在 260nm 处的消光值;

C 为每升溶液中磷的克原子数;

W 每升溶液中磷的重量;

30.98 是磷的原子量;

L 为比色杯内径, 一般为 1 厘米。

只要测得核酸溶液中磷的含量和消光值, 即可以求出它的 $\epsilon_{(P)}$ 。在 pH7 时, 天然的未变性的 DNA 的 $\epsilon_{(P)}$ 为 6,000—8,000; RNA 的 $\epsilon_{(P)}$ 为 7,000—10,000。核酸变性时, $\epsilon_{(P)}$ 值就大大升高; 当核酸复性时, $\epsilon_{(P)}$ 值便降低或恢复到原来的水平。因此, $\epsilon_{(P)}$ 可以作为核酸变性或复性的重要指标。

七、核酸的沉降特性和浮力密度

核酸是大分子, 它在溶液中的沉降行为不仅可以用来测定其分子量, 而且还可以用作研究核酸结构 (例如分子的形状、密度等) 的重要依据。在测定核酸分子量时, 应采用极稀的溶液。因为 DNA 的粘度很大, 溶液的浓度高, 测定的分子量往往不准确。

核酸在进行超离心时, 它就会在强大的离心力作用下沉降下来。核酸沉降的速度与它的分子形状和结构有关。根据大量实验数据分析, 核酸的沉降系数 (S) 与分子量之间呈现为对应关系 (图 4-38)。由于分子的构象对其沉降特性有很大的影响, 因此, 这种对应关系只是相对一定构象而言的。如果分子量相同, 其构象不同, 则沉降系数就会不同。环状 DNA 分子比同样大小的线性 DNA 分子的沉降系数大, 而在环状基础上所形成的超螺旋结构, 其沉降系数还要增大。

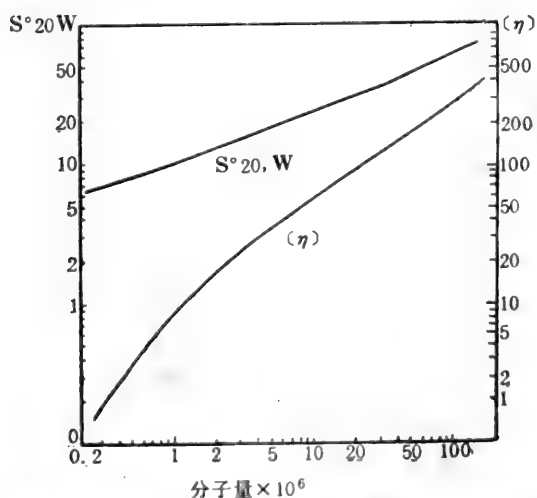


图 4-38 天然 DNA 分子量与沉降系数、粘度 (η) 的关系。沉降系数 S 用 $S^{20, W}$ 表示 (系用 20℃ 的水作溶剂测定的沉降系数)。

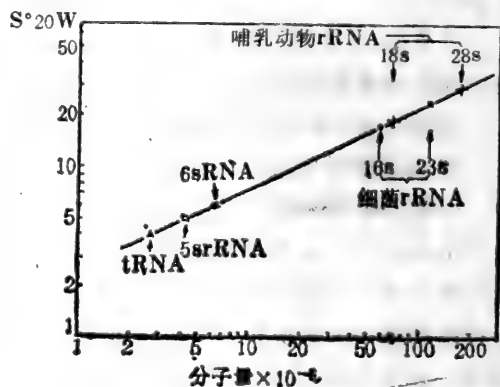


图 4-39 RNA 分子量 (溶在 0.15M 的 NaCl 溶剂中) 与沉降系数的关系

1963 年, J. Vinograd 等人从多瘤病毒中收得高纯度的 DNA 后, 在超离心时观察到分别相当于 20S、16S 和 14S 的三条不连续的带。由于是高纯度的 DNA, 因此每一条带就应该

相当于同一分子的一种不同的结构形式。14S 带代表该分子的线形双螺旋结构，16S 带代表该分子的完全松弛的开环结构，20S 带代表该分子的超螺旋结构(图4-40)。

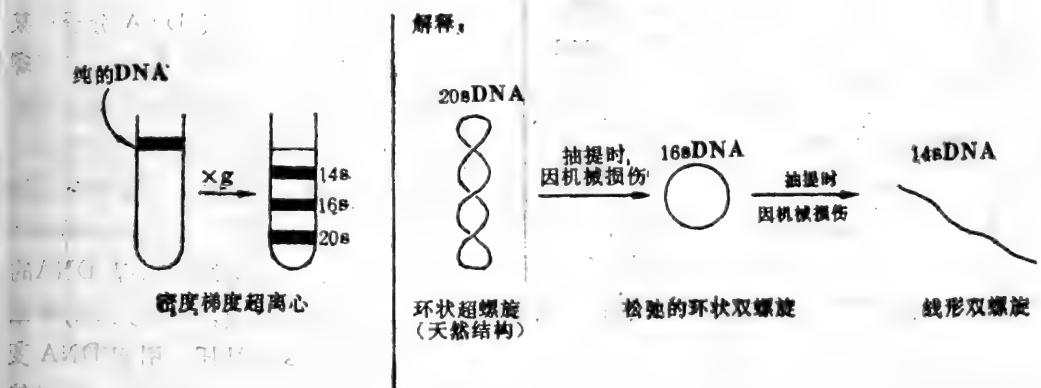


图4-40 从多瘤病毒中分离到的高纯度的 DNA 再经超离心分离，同一分子显示出不同的构象。20S 代表超螺旋，16S 代表开环结构，14S 代表线形结构。

同一种 DNA，变性后的沉降系数要比天然者大。因为 DNA 变性后，单股 DNA 随机卷曲成致密的线团。

当铯盐溶液例如氯化铯溶液以相当高的离心力离心时，分子沉降的倾向与分子随机扩散的相反倾向达到平衡时，将形成一种稳定的密度梯度。当把 DNA 放在这种溶液的上面，并以相当高的速度离心时，DNA 在梯度中迁移，直到它达到同自己的密度相同的部位为止，即漂浮于铯盐溶液的某一密度梯度中。这一部位就叫做该DNA的浮力密度(buoyant density)。不同的 DNA 具有不同的浮力密度。可以利用浮力密度的差别，借助密度梯度超离心法来分离制备 DNA。

DNA 的浮力密度与其分子的碱基组成有着密切的关系。含 G—C 较多的 DNA，其浮力密度比含 A—T 较多的 DNA 大。在中性氯化铯溶液中，DNA 的浮力密度与其 G—C 含量在20—80%范围内呈正比关系(图4-41)。Schildkraut 等人导出了下面的经验公式：

$$\rho = 1.660 + 0.098(G + C)$$

这里， ρ 是浮力密度，(G+C)表示 G—C 的百分含量。这样，可以根据浮力密度求出 G-C 的百分含量，反之，亦可以从 G—C 的百分含量求出浮力密度。

DNA 的浮力密度与 DNA 的分子构象有密切的关系，与分子大小没有关系。分子大小相同，构象不同，则浮力密度也不相同。环状结构比线型结构的浮力密度大，而超螺旋结构又比环状结构的浮力密度大。DNA 变性后，分子卷曲成致密的线团，故比天然 DNA 的浮力密度大。有些染料和抗菌素同 A—T 或 G—C 碱基对的结合具有强烈的专一性。由于这种结合会改变分子的构象，因而导致浮力密度的改变，利用这种特性可以改进对 DNA 分子的分离。

大多数 RNA 都是单股分子，只有局部双螺旋结构，它们的浮力密度比双螺旋 DNA 的浮力密度大。

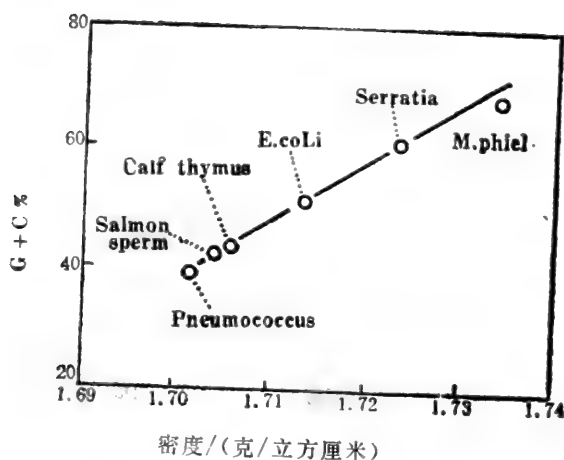


图4-41 DNA 的浮力密度与 G—C 百分含量间的关系

些变性剂如尿素、胍和某些有机试剂（如乙醇、丙酮等）。当溶液的 pH 值小于 4 时，可发生酸变性；pH 值大于 11 时，可发生碱变性。

将 DNA 稀溶液加热到 80℃ 左右几分钟，双螺旋结构就会受到破坏，氢键断开，两条链彼此分开，形成无规线团。这种变化称为螺旋→线团转换(helix-coil translation) (图4—42)。

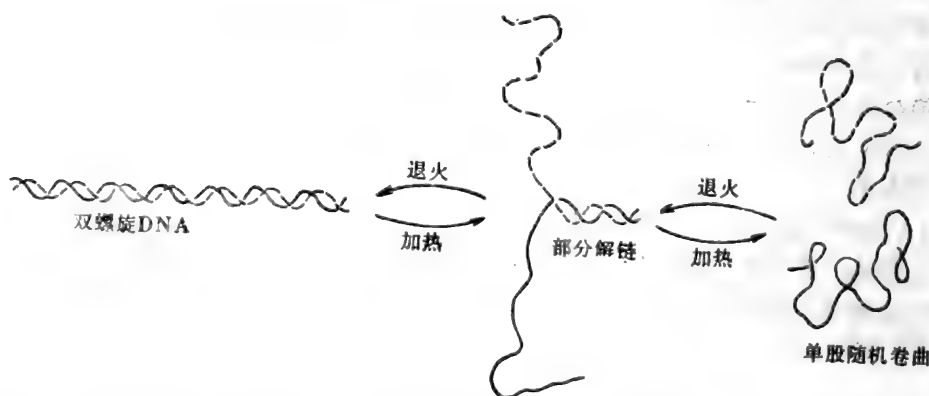


图 4-42 DNA 的变性与复性

任何多聚核苷酸在 260nm 处都有一个特征性的紫外吸收的最大值。但是，这种吸收在天然双螺旋 DNA 分子中，由于碱基的堆积而受到抑制，比组成双螺旋分子的两条单链处在随机卷曲状态的吸收或核苷酸单体总的吸收要低得多(图4-37)。这种现象称为低色效应或减色效应(hypochromic effect)。当 DNA 溶液慢慢加热，直到双螺旋开始解链之前，在 260 nm 处的吸收基本上保持不变。但当温度达到一定高度时（一般在 75℃ 以上），紫外吸收急剧增加，直到两条单链完全分开变成随机卷曲状态为止。这种螺旋→线团转换过程发生在一个较窄的范围之内。紫外吸收随变性程度加剧而升高的现象即称为高色效应或增色效应(hyperchromic effect)。一般来说，纯净的 DNA 分子变性后，紫外吸收增高 30—40%。

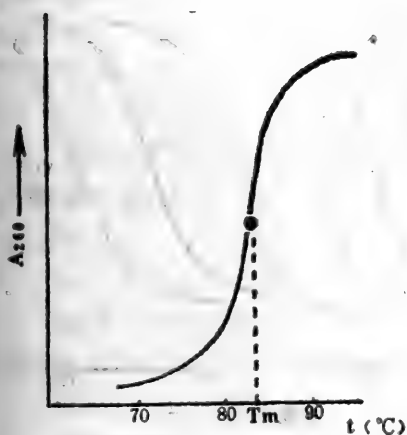


图4-43. DNA 的解链温度(T_m)

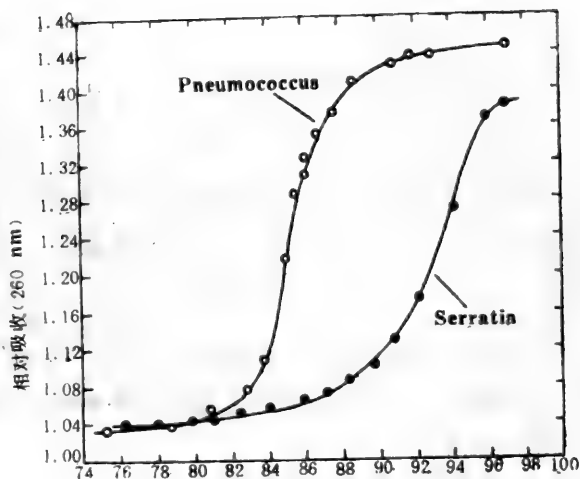


图4-44 两种不同 DNA 的 T_m 比较。

在热变性过程中,产生紫外吸收值跃变的温度称为 DNA 的熔点,通常是以增色效应达到一半时的温度作为熔点。此时,双股螺旋被解开一半。所以也把熔点称作解链温度或融解温度(melting-temperature),用 T_m 表示(图4-43)。图4-44表示两种 DNA 分子热变性解链曲线。每一种 DNA 都有一个特征性的解链温度。不同 DNA 分子的 T_m 的差别与它们的碱基组成有密切的关系。G-C 对含量较高的 DNA 分子其 T_m 值较高(图4-45),因为 G-C 碱基对比 A-T 碱基对给予 DNA 分子更大的稳定性,克服这种稳定性所需要的条件要剧烈些。在标准条件下,即在0.15mol/L氯化钠-0.015mol/L 柠檬酸钠($1\times SSC$)溶液中,确定了 T_m 与 DNA 碱基组成之间的经验关系:

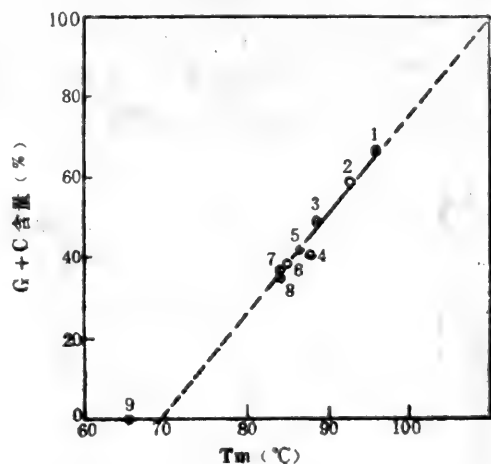


图4-45 DNA 的 T_m 值与 G-C 含量之间的关系。

1.草分枝杆菌, 2.沙门氏菌, 3.大肠杆菌, 4.鲑鱼精子, 5.小牛胸腺, 6.肺炎球菌, 7.酵母, 8.噬菌体 T_4 , 9.多聚 d(A-T)。

$$T_m = 69.3 + 0.41(G + C)$$

式中的(G+C)表示 G-C 的百分含量。在某些 DNA 分子中,例如在噬菌体 λ DNA 中某些区段含 G-C 多于 A-T,在热变性过程中可以观察到局部不同的 T_m

T_m 也受实验条件例如离子强度、pH 值等的影响。图4-46表示在不同离子强度下,同一种 DNA 分子其 T_m 是不同的。在离子强度较低的介质中, DNA 的 T_m 较低,而且解链

的温度范围较宽；在离子强度较高的介质中，DNA的 T_m 较高，解链的温度范围较窄。在离子强度低于 10^{-3}mol/L 的介质中，无需加热，就会使溶于其中的 DNA 发生不可逆变性。因此，DNA 样品不应保存在极稀的电解质溶液中，在 1mol/L 的氯化钠溶液中保存较为稳定。

pH 影响到碱基的解离，进而影响到碱基对之间的氢键的稳定性和解链温度。

如果 DNA 的组成比较均一，它的解链温度范围也就比较窄，若 DNA 的组成不均一，或者还混杂其他 DNA，它的解链温度范围也就比较宽。

DNA 在变性过程中，其物理性质和化学性质发生一系列的变化。除紫外吸收增值外，还有粘度下降、比旋度降低、沉降系数加大、浮力密度增高、酸碱滴定曲线改变等变化。DNA 变性，生物活性丧失，细菌 DNA 失去转化能力。

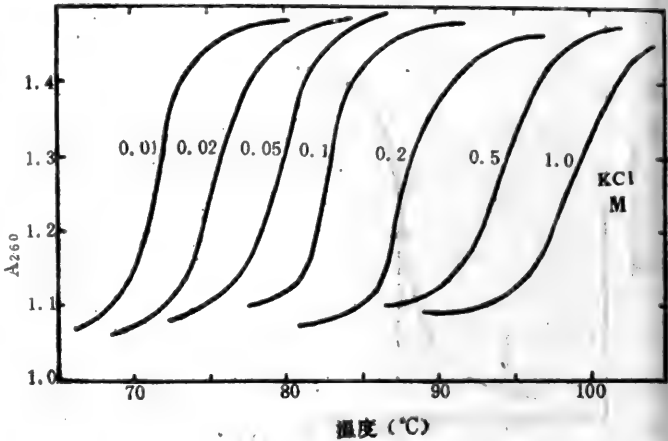


图4—46 大肠杆菌 DNA 在不同的盐浓度下的解链温度曲线，

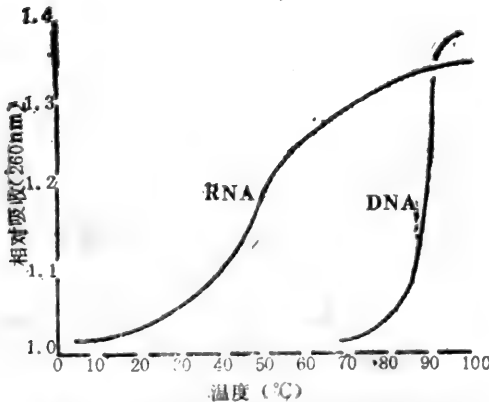


图4—47 RNA 和 DNA 变性曲线比较

如前所述，细胞内的 RNA 和病毒 RNA 通常是单股分子，在形成二级结构时，只有局部的双螺旋区。在热变性过程中，局部的双螺旋区也有螺旋→线团转换现象。通过分光光度计可以观测到紫外吸收值的上升。但是，这种变化不如 DNA 那样显著，变性曲线比较平缓， T_m 值较低，解链温度范围较宽（图4—47），而且变性是可逆的。RNA 的 T_m 也受螺旋区内的 G-C 碱基对以及介质中离子强度等影响。双股 RNA 的变性特征与双股 DNA 的几乎完全相同。

变性后的 RNA，其物理性质和化学性质也有相应的变化。

2. DNA 的复性

热变性后的 DNA 如果在低温下迅速冷却，两条单链仍然处在变性状态。倘若在热变性之后慢慢冷却，两条单链则可以重新结合回复到双螺旋结构。这一过程即称为复性 (renaturation)。DNA 复性后，伴随着一系列的理化性质的恢复，生物活性也可得到部分恢复。

复性过程表现为两个阶段。首先是成核 (nucleation)，其次是“拉链式” (zippering) 阶段。当有互补顺序的两条单链存在时，按碱基配对规则，先形成一定长度的碱基对。成核

现象作为两条单链之间的同源识别。如果同源则以“拉链式”方式进行，即碱基对在两条单链的其余部分之间的形成将很快进行，象“拉链”一样，从而完成整个复性。一个稳定的成核区是不长的，约为10—20个碱基对。

DNA 的复性速度受到很多因素的影响。

(1) DNA 的大小

DNA 片段小的比大的复性容易，信息含量少的比信息含量多的易于复性。因为太大，在介质中遇到扩散问题，寻找互补链的机会大大减少，往往不能准确地重新结合，影响复性的速度。

(2) 离子强度

离子强度对复性实验有很大的影响。增加盐的浓度，两条互补单链重结合的速度加快。因为盐能中和两条单链中的磷酸基团的负电荷，减少荷负电的互补单链的相互排斥。

(3) DNA 的浓度

由于复性需要两条互补单链相互接触才能重新结合形成双股螺旋分子。可以想见，DNA 的浓度大，两条互补单链彼此相遇的可能性就加大，复性的速度也就会加快。所以，复性的速度服从二级反应动力学，即重结合的速度与两条反应单链的浓度成正比。

通常用 $Co \cdot t$ 来衡量复性的速度。这里， Co 是变性 DNA 的起始浓度，以每升中核苷酸的摩尔数来表示； t 代表在二级反应中保温的时间，以秒计。 $Co \cdot t$ 与复性速度成反比（图 4—48）。DNA 分子信息含量愈大，复性所需要的时间就愈长。例如，在起始浓度相同的情况下，大肠杆菌 DNA 的 $\frac{1}{2}Co \cdot t$ 约为 $9 \text{ mol/L} \cdot \text{秒}$ ，而 T_4 噬菌体 DNA 的 $\frac{1}{2}Co \cdot t$ 约为

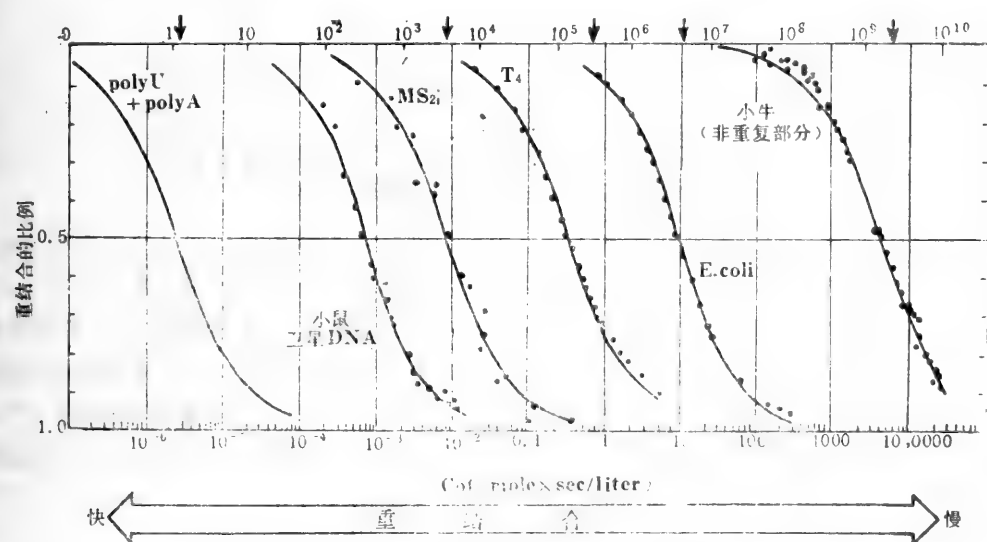


图4—48 不同生物来源的 DNA 复性速度的比较

$0.3 \text{ mol/L} \cdot \text{秒}$ 。这表明， T_4 噬菌体 DNA 比大肠杆菌 DNA 复性速度快30倍。因为大肠杆菌 DNA 分子比 T_4 DNA 分子大得多，即结构和信息含量比 T_4 DNA 复杂得多。在溶液中

核苷酸总浓度相同的条件下，大肠杆菌 DNA 互补单链数就比 T₄ DNA 少得多，扩散的阻力也大得多，因而复性的速度就慢得多。哺乳动物基因组的 $\frac{1}{2}C_0 \cdot t$ 约为 $10^4 \text{ mol/L} \cdot \text{秒}$ 。若实验所用的 DNA 的浓度为 10^{-4} mol/L ，则需要 10^8 秒才能达到 $10^4 \text{ mol/L} \cdot \text{秒}$ ，即需要约三年的时间才有一半重新结合。在复性实验中还发现，约有 10% 的小鼠 DNA 的复性速度比病毒 DNA 的还要快。这表明小鼠 DNA 含有很多的重复顺序。因为在某一 DNA 内只有同时存在很多相同或很相似的顺序，才能很容易找到互补顺序。用 DNA 复性动力学的方法业已证明真核生物染色体 DNA 存在有高度重复顺序、中度重复顺序和单一顺序（见图 4—49 和第四节）。

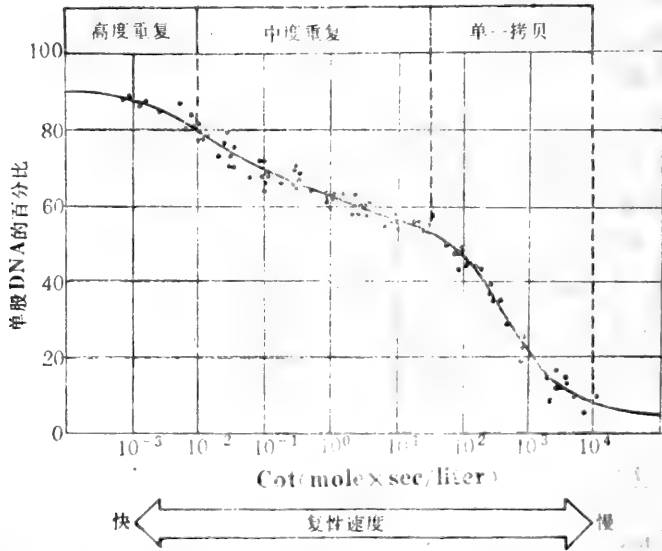


图4—49 人体基因组 DNA 复杂的复性动力学曲线表明在 DNA 分子中存在高度重复、中度重复和单一顺序。

变性 DNA 在一定条件下的重结合，不仅可以在同一起来源的两条互补单链之间进行，而且也能在不同来源的两条 DNA 单链之间进行，甚至可以在 DNA 和 RNA 之间进行。因为重结合是以互补碱基顺序为基础的，只要在两条单链之间存在有互补顺序（虽不是整个顺序）就可以相互结合形成双链。所以，在 DNA 变性和复性的基础上建立了一种非常有用的技术——分子杂交 (molecular hybridization)。利用分子杂交技术可以分离蛋白质的基因，研究基因的转录和调节控制。近年来，分子杂交技术已经广泛地应用于 DNA 分子信息含量以及不同 DNA 分子的亲缘关系的测定。

第七节 核酸类物质的制备

一、核苷酸类物质的制备

核苷酸和核苷酸衍生物是一类在代谢上起着十分重要作用的物质。这类物质在人们的生

活以及医药上的作用已引起了高度的重视。核苷酸类物质的生产制备主要采取两种不同的方式，一种是以微生物发酵法大量生产，例如肌苷酸通常就是采用这种方法生产的；另一种方式是水解法。水解法制备核苷酸是以核酸为原料，采用碱水解或酶水解的方式。这里我们主要介绍 RNA 的碱水解以及 DNA 和 RNA 的酶水解。

1. RNA 的碱水解

在稀碱（例如 0.3—1 mol/L 的 NaOH 溶液）的条件下，RNA 很容易被水解得到 2'-3'-核苷酸的混合物。若进一步水解还可以得到核苷。在 RNA 分子中，核苷酸之间是以 3', 5'-磷酸二酯键连接的，水解后似乎不应产生 2'-核苷酸，但是，事实上用稀碱水解 RNA 却得到了 2'-核苷酸。原因是：在碱催化水解的过程中，先要形成一环状中间物 2', 3'-环状核苷酸（图 4—50）。这个中间物很不稳定，随即被碱水解，得到 2'-和 3'-核苷酸的混合物。

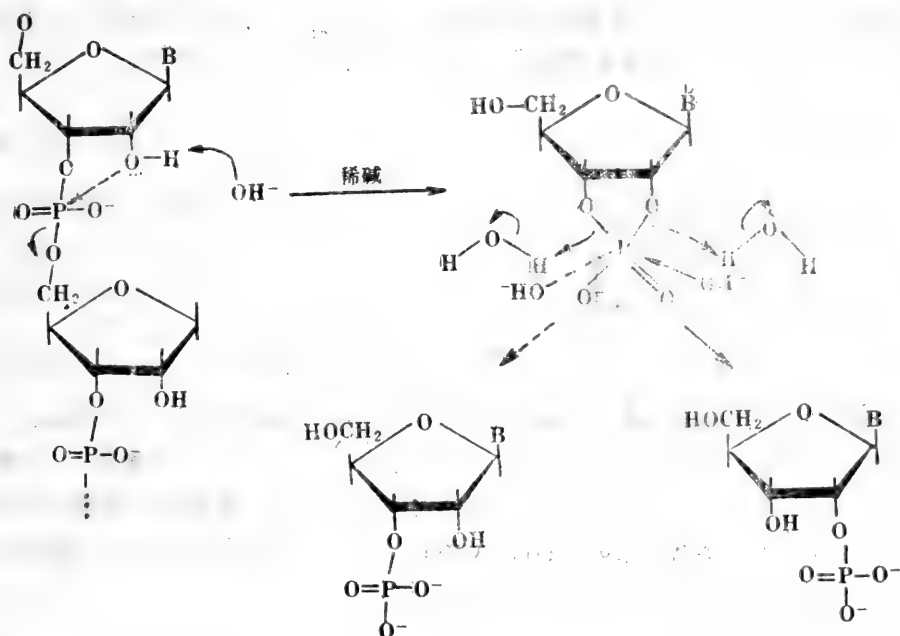


图 4—50 RNA 碱水解机制

在 RNA 分子中，由于 C_2' 上的 $-\text{OH}$ 的诱导电子的效应，使磷原子带上微弱的正电荷，有利于碱 (OH^-) 的亲核攻击。所以，RNA 能被碱水解。但在 DNA 分子中， C_2' 上没有羟基 ($-\text{OH}$)，不能产生邻近基团参与效应，因此在碱性条件下不能形成 2', 3'-环状核苷酸，也就不能被碱水解了。利用 DNA 和 RNA 对碱稳定性的这种差别，可以将二者分离开来。在 rRNA 和 tRNA 中发现有 2'-O-甲基核糖，邻近这种甲基化核糖的磷酸二酯键对碱以及对 RNaseA 都是稳定的，不能被水解，因为不能形成 2', 3'-环状中间物。

前面，我们曾经提到 C—N 糖苷键对酸不稳定，因此，DNA 和 RNA 分子中的 C—N 糖苷键可被酸水解。在常温下用稀酸水解 DNA 时可以得到无嘌呤酸（即脱去嘌呤碱基的 DNA）。升高温度（例如在高压釜内或封闭管中与酸共热），或增高酸的浓度也可以把 RNA

上的碱基水解下来。用酸水解核酸，随水解时的温度、酸的浓度以及酸的性质不同而产物也不相同。

2. 核酸的酶水解

DNA 和 RNA 在各种不同核酸水解酶的催化下产生核苷酸。

(1) RNA 的酶水解

前面已经介绍了几种 RNase，例如 RNaseA 和 RNaseT₁，这两种酶都是内切酶。由 RNA 制备核糖核苷酸主要是用两种常见的核酸外切酶，即蛇毒磷酸二酯酶 (Snake venom phosphodiesterase, 简称 VPD 或 VPDase) 脾磷酸二酯酶 (Spleen phosphodiesterase, 简称 SPD 或 SPDase)。

蛇毒磷酸二酯酶是制备5'-核苷酸 (5'-NMP) 时经常使用的一种外切核酸酶。这个酶既能水解 RNA，又能水解DNA。所以，它是一种非专一性的外切酶。蛇毒磷酸二酯酶作用于多核苷酸时是从3'-OH 端开始依次逐个水解除去一个5'-核苷酸 (图4-51)，因而该酶作用的产物是5'-核苷酸。若 3'-端是磷酸基，则该酶不能从3'-端开始水解。

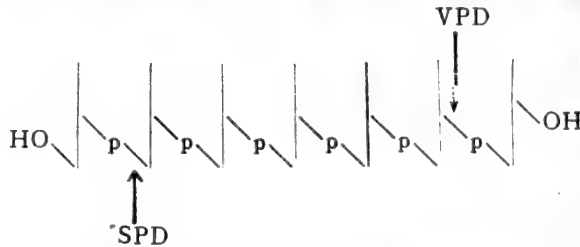


图4-51 VPD 和 SPD 的作用部位

从桔青霉中分离出来的磷酸二酯酶具有同蛇毒磷酸二酯酶相同的作用特性。

脾磷酸二酯酶是制备3'-核苷酸 (3'-NMP) 时常用的一种外切核酸酶。这个酶既能水解 RNA，也能水解 DNA。所以它也是一种非专一性的外切酶。脾磷酸二酯酶作用于核酸时，从5'-OH 端开始依次水解产生3'-核苷酸 (图4-51)，因而该酶作用的产物是3'-核苷酸。若5'-端是磷酸基，则该酶不能从5'-端开始水解。

(2) DNA 的酶水解

以 DNA 为原料制备脱氧核苷酸时常用酶水解方法。能降解 DNA 的酶很多，这里仅介绍几种。

胰脱氧核糖核酸酶 (DNase I) (EC3.1.4.5) 是从胰脏中分离出来的一种作用 DNA 的内切酶。这个酶的分子量为31,000，其等电点为4.7。该酶分子中含有两个二硫键，很容易被巯基乙醇还原而失去催化活性。DNase I 的最适 pH 范围是6.8—8.2，反应时需要 Mg^{++} 或 Mn^{++} 。DNase I 作用于 DNA 时，产生平均链长为四核苷酸的片段，产物的5'-端具有磷酸基，3'-端含有一OH。DNase I 既能水解天然 DNA，也能水解变性 DNA，但前者速度大于后者。0.01mol/L 的柠檬酸盐即可完全抑制由 Mg^{++} 激活的活性，但对 Mn^{++} 激活的活性无抑制作用。柠檬酸盐对酶活性的抑制作用在于它能整合除去 Mg^{++} 。

DNase I 作用的产物——3'-端具—OH 的寡核苷酸片段可被蛇毒磷酸二酯酶进一步水解，产生5'-脱氧核苷酸 (5'-dNMP) (图4-52)。当然，DNA 直接用蛇毒磷酸二酯酶水

解亦可产生5'-脱氧核苷酸，只要3'-端含有自由的一OH。

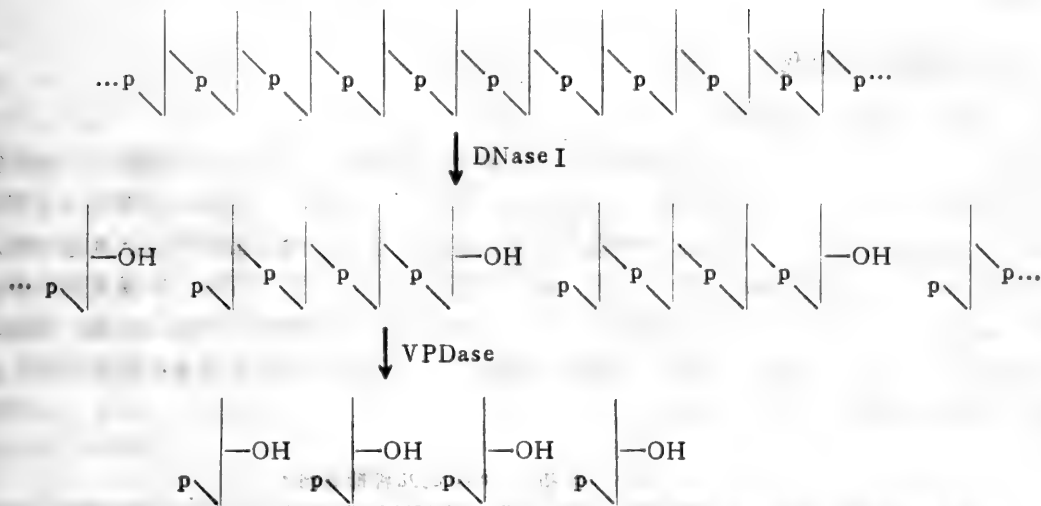


图4—52 用 DNase I 降解 DNA 后，接着用 VPDase 处理可产生5'-脱氧核苷酸

脱氧核糖核酸酶Ⅱ（DNaseⅡ）（EC3.1.4.6）是一种 DNA 内切酶。这个酶的分子量为40,000，最适 pH 范围是4.5—5.5。从胸腺和脾脏中分离的 DNaseⅡ不需要 Mg⁺⁺。

用脾 DNaseⅡ水解双螺旋 DNA 是分步进行的。首先脾 DNaseⅡ在同一点上攻击双螺旋的两条链，产生链长为14—100个核苷酸的片段，这些片段最终被该酶进一步降解成 平均链长为六核苷酸的寡核苷酸片段，寡核苷酸的3'-端带有磷酸基，5'-端具有一OH。

DNaseⅡ作用的产物——5'-端具有一OH的寡核苷酸片段可被脾磷酸二酯酶进一步水解，产生3'-脱氧核苷酸（3'-dNMP）（图4—53）。当然，只要 5'-端具有一OH，亦可以直接用脾磷酸二酯酶处理产生 3'-核苷酸。

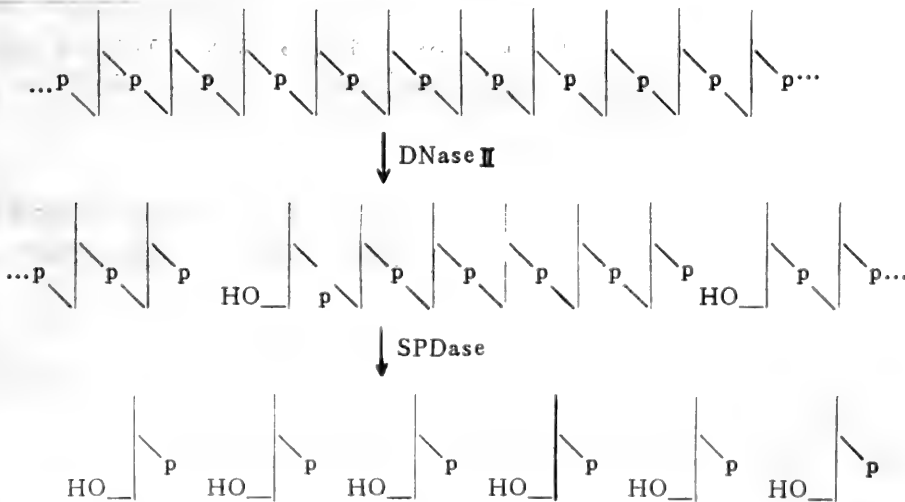


图4—53 用 DNaseⅡ降解 DNA 后，接着用 SPDase处理可产生3'-核苷酸

用上述水解法制备产生的各种核苷酸，可以根据它们带电性质的差别采用离子交换的方法将它们分离纯化。

二、核酸的分离纯化

1. 制备核酸的一般原则

要对核酸进行研究，首先需要制备单一的、纯净的核酸样品。但是，在细胞内，核酸常和蛋白质结合成核酸-蛋白质复合物（核蛋白，即 DNP 和 RNP）。而且，在细胞内还存在许多其他蛋白质及糖类杂质。欲分离提纯核酸，就需要想办法除去蛋白质以及其他杂质。核酸分子很大，特别是 DNA 的分子更大，而且很不稳定，在提取过程中，容易受到许多因素，例如温度、酸、碱、变性剂、机械力，以及各种核酸酶等的破坏而变性、降解。因此，在分离提纯核酸时，应尽可能在低温下操作，避免过酸过碱和其他变性因素，同时还要注意使用核酸酶的抑制剂（表4—13）。

表4—13 RNase 和 DNase 的几种抑制剂

抑 制 剂	作用特性	抑制对象
柠檬酸钠	整合 Mg^{++}	DNase
乙二胺四乙酸(EDTA)	整合 Mg^{++}	DNase
皂 土	结合金属离子和碱性蛋白(RNase)	RNase
肝 素	能与 RNase 结合	RNase
聚乙烯基硫酸盐 (Polyvinyl sulphate)		RNase
焦磷酸二乙酯 (Baycovin)	能同 RNase 的活性中心的 His 作用， 但也同 RNA 起反应	RNase
多 胺	同 RNA 结合后抗 RNase	RNase

如前所述，DNP 不溶于0.14 mol/L 的 NaCl 溶液中，而 RNP 则能溶于0.14 mol/L 的 NaCl 溶液中，利用这一性质可以从破细胞后的均浆液中将 DNP 和 RNP 分开。然后可以用下述试剂除去核酸中的蛋白质。

①十二烷基硫酸钠(SDS)

SDS 是一种阴离子去垢剂，蛋白质的变性剂，也是 RNase 的抑制剂。它能使蛋白质变性而与核酸分开。一般先加入0.5%的 SDS，搅拌两小时左右，使蛋白质变性，然后离心分离，即可得到含有核酸的上清液。

②酚或氯仿

酚或氯仿都是蛋白质的变性剂，与核蛋白一起振荡后离心，可使核酸和蛋白质分开，视情况也可反复抽提几次除去蛋白。

③蛋白质水解酶

将抽提出来的核蛋白在一定条件下与蛋白质水解酶反应，降解核蛋白中的蛋白质。通常使用广谱蛋白酶的，例如链霉菌蛋白酶(pronase)，它是从灰色链霉菌中分离制得的，几乎能

把任何一种蛋白质降解成氨基酸。

由于核酸的种类多,制备核酸的目的又不相同,故分离纯化核酸的方法也不尽相同。可根据 DNA 和 RNA 各自的特性采用不同的方法进行分离和纯化。例如密度梯度超离心法、羟基磷灰石法、电泳法等等。这里不一一说明,读者可参阅有关书籍。DNA 和 RNA 的一般制备方法,生化实验教科书中已作了介绍,这里从略。下面仅就 mRNA 和细菌质粒 DNA 的分离纯化的方法作些介绍。

2. mRNA 的分离纯化

mRNA 是基因转录的产物,是蛋白质合成的直接模板。mRNA 对于基因表达(特别是真核生物基因的表达)、核酸结构分析、遗传工程等方面的研究是不可缺少的。因此,mRNA 的分离纯化有着重要的意义。

从真核生物中分离纯化 mRNA 的过程大体上可分为两步。首先是从破细胞后的提取液中提取总 RNA;或者从去除线粒体后的上清液中提取多核糖体。然后,再从总 RNA 中或从多核糖体中分离提纯 mRNA。

(1) 总 RNA 的制备

酚抽提法是提取总 RNA 最常用的方法。在破细胞时加入用酚饱和的缓冲液一起匀浆,离心后得到上清液。取上清液再加入等体积的缓冲液饱和的酚,搅拌一定时间后离心。离心后分为三层,上层水相,含有 RNA;中间层为变性蛋白,下层为酚相。取出水相,加入固体醋酸钠至 2% 浓度,再加入 2—3 倍冷的无水酒精沉淀 RNA,再经离心,便可得到总 RNA。

(2) mRNA 的分离

① 亲和层析法

得到的总 RNA 溶于适当的缓冲液中,然后通过亲和层析的方法分离出 mRNA。

前面已介绍真核细胞 mRNA 的 3'-端大多具有 poly A 的结构。利用这种结构上的特征建立了一种十分有效的分离纯化 mRNA 的方法。将化学合成的寡聚 dT(Oligo(dT)) 结合在纤维素上或将寡聚 U(Oligo(U)) 结合在琼脂糖上,做成亲和层析柱。把得到的总 RNA 上样到亲和层析柱上,以适当的流速通过此柱。按照碱基互补配对的原则,带有 Poly A 的 mRNA 便结合在柱上。其他不具 poly A 的 RNA 随着缓冲液流出层析柱。然后改变洗脱条件,把 mRNA 从层析柱上淋洗下来,从而获得很纯的 mRNA。

② 镁离子沉淀法

在制备细胞或组织匀浆时加入中性去垢剂 Triton X-100 及核酸酶抑制剂肝素(1.0mg/ml),经 $27,000 \times g$ 离心得到含多核糖体的上清液,再用 100mmol/L $MgCl_2$ 在 $0^\circ C$ 保温一小时,使多核糖体被 Mg^{+} 沉淀而与可溶性蛋白分离。再经 $27,000 \times g$ 离心 10 分钟收集多核糖体。用 SDS(0.5%)-酚-氯仿系统从多核糖体中提取 mRNA。此法最大的优点在于简便易行,只用镁离子即可达到分离多核糖体的目的,从而省去超离心手续

③ 超离心法

组织匀浆液加入适当的缓冲液(含有肝素),于 $27,000 \times g$ 离心约 30 分钟,以除去线粒体,其上清液再于 $105,000 \times g$ 离心,即得到多核糖体沉淀。然后用酚抽提除去核糖体蛋白,即可得到 mRNA。

上述方法得到的 mRNA 均是细胞内总的 mRNA。若用分化很专一的组织或细胞，例如网织红细胞，90% 的蛋白质都是珠蛋白，从这样的组织或细胞中分离纯化的 mRNA 则是比较单一的。

④ 免疫沉淀法

免疫沉淀法是分离纯化单一 mRNA 的最有效的方法。免疫沉淀法的基本原理是：特定的蛋白质产生的抗体能专一地同该蛋白质产生免疫沉淀反应。若该蛋白质正在多核糖体上合成，则所发生的免疫沉淀反应就会连同多核糖体一起沉淀下来。利用这个性质就可以分离得到单一的多核糖体。然后使多核糖体解离，再用亲和层析方法将 mRNA 提取出来。免疫沉淀法可分为单抗体法和双抗体法，其基本原理都是一样的。

例如，欲分离卵白蛋白 mRNA，可以用完全纯净的卵白蛋白作为抗原去免疫兔子，并分离纯化兔子所产生的抗卵白蛋白抗体（抗卵白蛋白）。将超离心得到的卵巢多核糖体（实际上是一种混合的多核糖体）同抗-卵白蛋白于 4℃ 保温，含有正在合成卵白蛋白的多核糖体便与抗-卵白蛋白进行抗原抗体反应而沉淀下来。经过离心即可得到单一的、合成卵白蛋白的多核糖体。在此基础上就可进一步分离到卵白蛋白 mRNA。

图4—54为双抗体（间接免疫）法分离单一 mRNA 的原理示意。双抗体法可以增强沉淀效果，以便获得更多的单一的 mRNA。

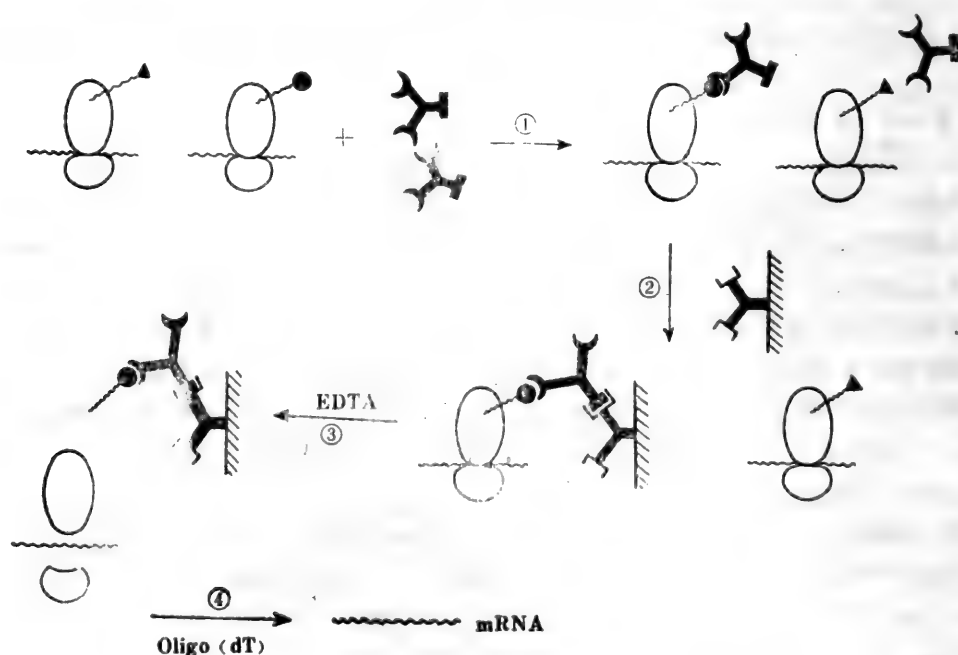


图4—54 双抗体法分离单一的 mRNA

- ① 混合多核糖体与第一抗体反应，得到单一的多核糖体；
- ② 单一多核糖体与第二抗体反应，使单一多核糖体结合在载体上；
- ③ 使单一多核糖体解离；
- ④ 用 Oligo(dT) 亲和层析柱分离得到单一的 mRNA。

(3) mRNA 纯度及活性检测

分离纯化得到的 mRNA, 应对它的纯度及生物活性进行检测。一般包括以下几方面。

①紫外分光光度法鉴定所得到的 mRNA 的吸收光谱曲线, 比较 A260、A280和 A230的比值是否符合一个好的 mRNA 的标准($A_{260}/A_{230} > 2.0$, $0.45 < A_{280}/A_{260} < 0.5$)。

②电泳分析确定 mRNA 的均一性。例如鼠肝白蛋白的 mRNA 经分离纯化后, 在聚丙烯酰胺凝胶电泳中呈现为一条带, 说明纯度较高。

③生物活性检测。检测 mRNA 的生物活性就是指在体外蛋白质合成体系(即无细胞测活系统)中检测被纯化的 mRNA 合成蛋白质的能力。目前常采用的测活系统有麦胚无细胞系统、兔网织红细胞无细胞系统以及 Krebs—II 腹水细胞无细胞系统等。在给予蛋白质合成所必需的氨基酸(其中一种用放射性同位素标记, 以便检测)和能量等条件时, 被分离纯化的 mRNA 可以在无细胞测活系统中合成蛋白质。根据参入到蛋白质中的放射性的计算便可了解到被分离纯化的 mRNA 的生物活性。

④产物鉴定。产物的鉴定可以用免疫沉淀试验和电泳分析等方法。被分离纯化的 mRNA 在体外合成的蛋白质可以用专一于该蛋白质的抗体与其进行免疫沉淀反应。具有放射性标记的体外合成的蛋白质可进行电泳分析, 并通过放射性自显影技术同时与标准蛋白的迁移率比较。

3. 细菌质粒 DNA 的分离纯化

细菌质粒(Plasmid)DNA 是细菌染色体 DNA 外的遗传物质, 具有自主复制的能力。质粒 DNA 游离地存在于细胞质中, 分子量很小, 是共价闭合的双链环状结构。由于质粒在遗传工程中的重要应用, 所以质粒 DNA 的结构与功能、以及生物学特征等都是重要的研究课题。然而, 无论哪方面的研究, 大多涉及到质粒 DNA 的分离纯化。

目前, 分离纯化的方法很多。在这些方法中大多是根据质粒 DNA 与细菌染色体 DNA 在结构上的差别建立起来的。细菌染色体 DNA 虽然也是双链环状结构, 在细胞内以复杂的超螺旋结构存在。但是, 由于它的分子大, 在分离提纯过程中, 很容易受到各种因素, 特别是机械剪力的作用而降解, 因此很难保持它的环状超螺旋结构。然而, 质粒 DNA 却不一样。由于质粒 DNA 分子小, 紧密的超螺旋结构不容易受到破坏, 容易获得完整的环状结构。它们在结构上的这种差别, 就构成了把质粒 DNA 和染色体 DNA 分离开来的基础。下面简要介绍用溴化乙锭-氯化铯密度梯度超离心分离纯化质粒的方法。

将含有质粒的大肠杆菌培养好后, 收集菌体。先用溶菌酶破细胞, 加入 EDTA 抑制 DNase 的活性。再加入 SDS 至终浓度为 1%, 振荡, 进一步破细胞。然后加入高浓度的 NaCl 溶液至终浓度为 1mol/L。在 SDS 和较高盐浓度下, 绝大部分染色体 DNA 优先沉淀下来。离心, 取上清液, 再用 RNase 和蛋白酶处理, 用缓冲液饱和的酚去除蛋白, 即可得到含质粒 DNA 的粗提取液。在溴化乙锭和氯化铯存在下, 于 15℃ 进行密度梯度超离心, 可将残留的染色体 DNA 与质粒 DNA 分开。由于质粒 DNA 超螺旋结构的物理束缚, 限制了单位长度碱基对间插入溴化乙锭的数目。因此, 具有超螺旋结构的质粒 DNA 比开环的或线性的 DNA 的浮力密度降低得要少些, 加大了它们之间的密度差别。在密度梯度离心之后, 质粒 DNA 便沉降在染色体 DNA 和开环型 DNA 带之下。取出质粒 DNA 后, 用异丙醇抽提除去溴化乙锭, 即可得到高纯度的完好的质粒 DNA。

第五章 维生素

维生素是需量很少，但维持正常生命活动不可缺少的一类有机物，特别是动物不能自身合成，必须由外界供给。维生素结构有多种多样，功能各异。一般按其物理性质不同分为水溶性和脂溶性维生素两类。前者的生理功能研究得较为详尽，大多数是活体内各种酶的辅酶或辅基的组成部分。而后者目前还在进一步对其功能进行研究。从已获得的成果看，功能似乎更为多样，有些也可作为某种酶的辅基或辅助因子的组分，有些则在生命活动过程中作为某些基团载体参与生化反应，还有一些则有类似于激素的功能。

第一节 水溶性维生素

水溶性维生素的结构多样，但都具极性，能溶于水，故名水溶性维生素。

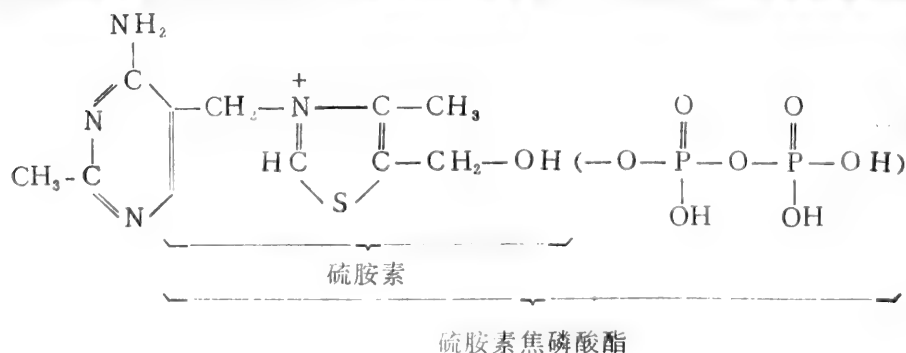
除钴氨素（维生素 B_{12} ）外，所有水溶性维生素都能在植物中合成。所以它可由豆类、禾谷类、绿叶蔬菜、水果、酵母等提供，肉类和乳制品也是该维生素的主要来源。由于都具水溶性，所以它们大都没有稳定的贮藏形式，必需不断地供给，才能满足动物需要，但钴氨素则能在人肝脏贮存数年之久。大部分水溶性维生素都具辅酶功能或可作为酶的辅助因子。

对人类营养较重要的水溶性维生素有硫胺素（维生素 B_1 ）、核黄素（维生素 B_2 ）、泛酸（维生素 B_3 ）、烟酸（维生素 B_5 或 PP）、吡哆醛（维生素 B_6 ）、生物素、钴胺素、叶酸和维生素 C 等九种，前八种属维生素 B 复合物。

一、硫胺素(Thiamine)

硫胺素是由取代嘧啶和噻唑衍生物用次甲基连接而成。它存在于大多数植物和动物性食物中，以糙米和肉类中较为丰富。某些鱼类肌肉中含有热不稳定硫胺素酶，所以有吃生鱼习惯者，常导致硫胺素缺乏。其缺乏症表现在食欲不振、四肢无力、痉挛性下身麻痹和神经系统损伤等。动物由肠道吸收硫胺素，在体内无明显贮存，多余的由尿排出。尚未发现硫胺素过多有什么毒害。

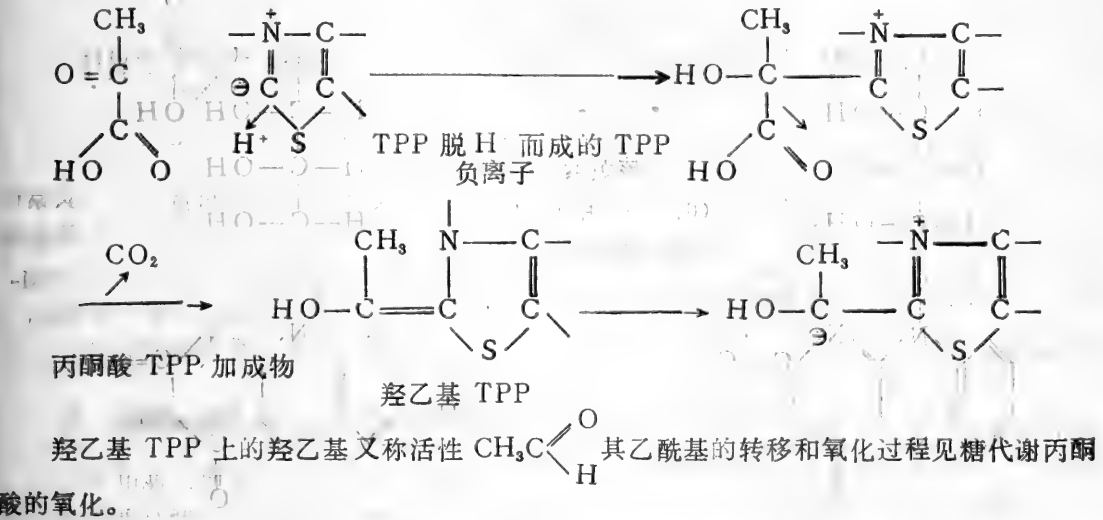
在肝和脑中存在一种硫胺素焦磷酸转移酶(又称硫胺素焦磷酸激酶)，能把 ATP 上的焦磷酸转移到硫胺素上成为活性形式的焦磷酸硫胺素(TPP)硫胺素及其焦磷酸酯的结构如下：



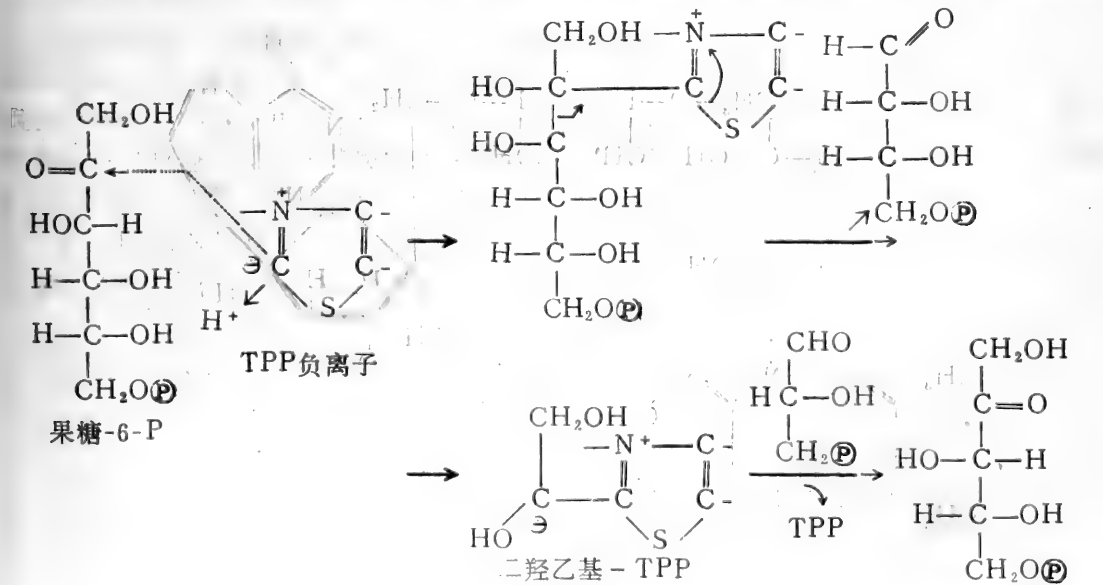
肠胃道中和其它人体组织中含有一种磷酸酶能水解硫胺素焦磷酸酯，释放焦磷酸。

TPP 的生化功能是在酶促酮酸氧化脱羧反应和转酮酶所催化的反应中，作为辅酶而起作用。其主要活性基团是噻唑环，由于 S 和 N 的强电负性，使 N 和 S 之间的碳原子上很易失去一个 H⁺，而成为负碳离子。该负碳离子又因邻近 = N⁺ 离子的影响，而较为稳定。负碳离子是一个强亲核基团，能与酮基起亲核加成反应生成酮与 TPP 的加成产物。然后由于噻唑环的吸电子效应而进行脱羧、脱糖，再进一步进行某基团转移。

丙酮酸脱氢酶复合物（见糖代谢）就含有 TPP 辅酶组分，它使丙酮酸脱羧，其机制示于下式：



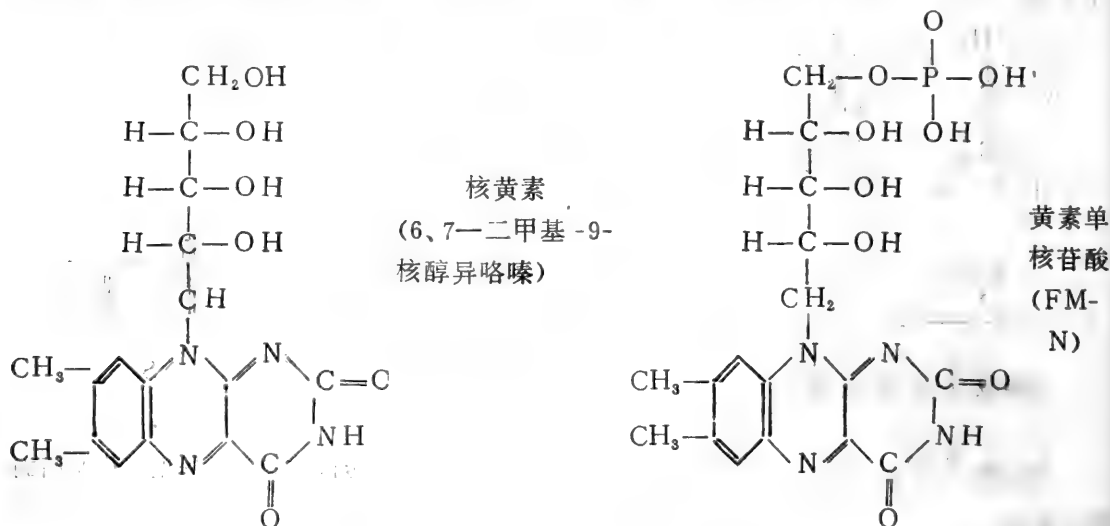
在转酮酶所催化的反应中，TPP 的负碳离子首先亲核攻击某酮糖的酮基形成酮糖 — TPP 加成物，然后由于噻唑环的拉电子效应而脱去一个醛糖成为二羟乙基 — TPP，再将活性羟乙基转移到另一醛糖分子上，形成新的酮糖。反应如下式所示：



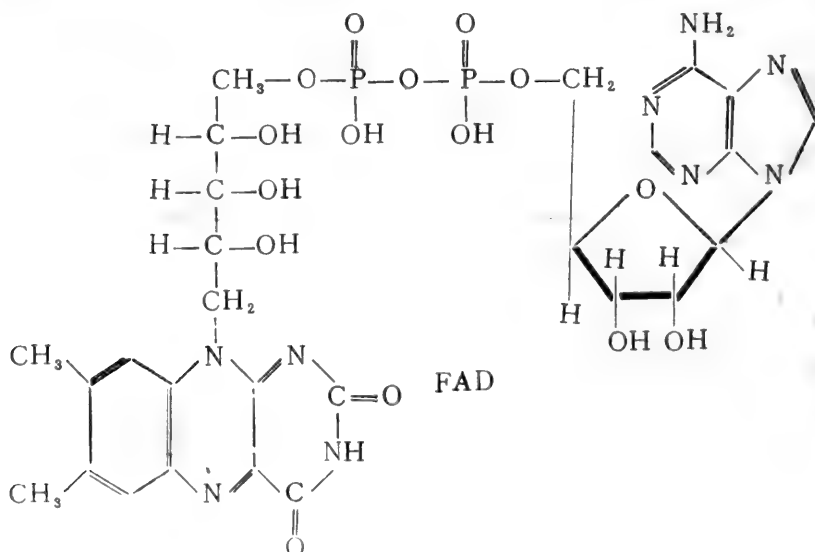
TPP 作为辅酶参与其它反应的实例见代谢各章节。

二、核黄素(Riboflavin)

核黄素是苯并咪唑的衍生物和核醇结合而成。由于它含多共轭体系环，故具黄色荧光，因而称核黄素。它热稳定性好，但暴露于可见光下则导致不可逆分解。所有植物和许多微生物都能合成核黄素，高等动物则不能。在肠中吸收的核黄素，旋即于肠粘膜上被黄素激酶催化，使之磷酸化成为磷酸核黄素，又称黄素单核苷酸。它们的结构式为：

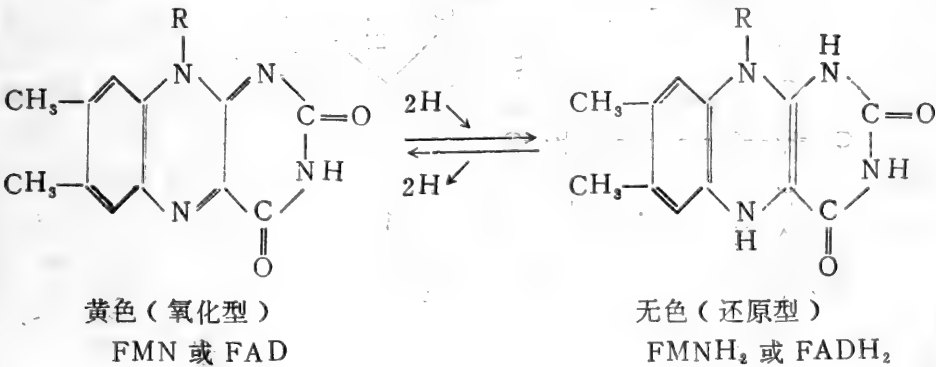


黄素单核苷酸与一分子 ATP 作用，则 ATP 中的 AMP 转移到 FMN 的磷酸基上成为腺嘌呤黄素二核苷酸(FAD)，其结构如下：



FMN 和 FAD 是许多氧化还原酶的辅基，这些酶通称黄酶或黄素蛋白。这两种辅基，紧密地但非共价地与蛋白结合。有许多黄素蛋白以金属离子作为辅助因子，称为金属黄素蛋白。

在黄酶催化过程中，黄素部分的异咯嗪环能可逆地使 FMN 和 FAD 还原成 FMNH₂ 和 FADH₂。在还原型中，共轭体系已切断，故褪色。



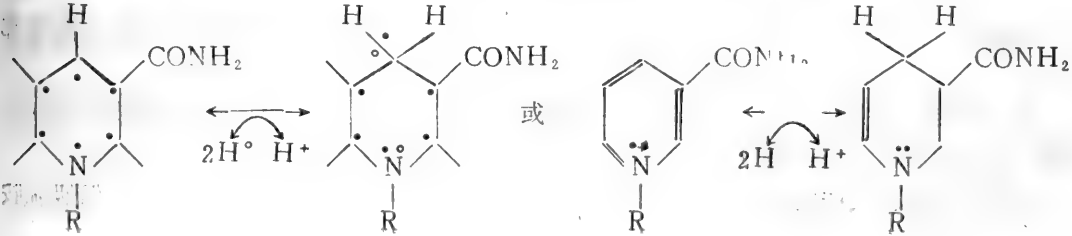
由于动物不能合成核黄素，所以必需由食物供给。人体缺核黄素常生口舌炎，动物孕期缺乏它常导致畸形胎生成。

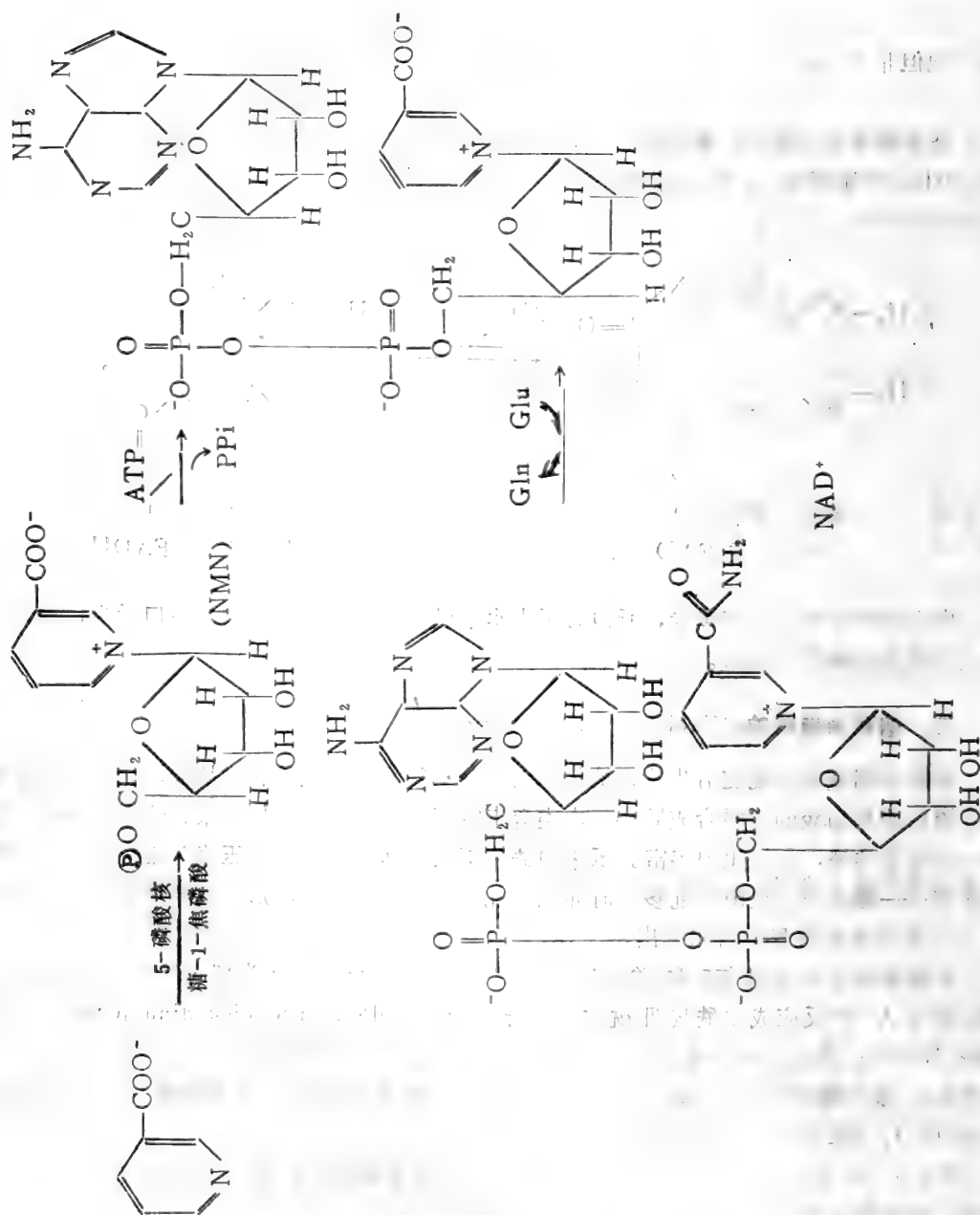
三、烟酸和烟酰胺(Niacin 和 Nicotinamide)

烟酸和烟酰胺是吡啶衍生物，植物和大部分动物能从色氨酸合成烟酸，因此含色氨酸丰富的蛋白质是烟酸的主要合成原料。肉类含丰富烟酸，其它食物如糙米、粗面、酵母、乳类及一些叶菜类等，含量也很丰富。玉米中缺色氨酸和烟酸，因此以玉米为唯一食品会造成缺烟酸症——癞皮病。缺磷酸吡哆醛时亦出现此症。烟酸以烟酸盐形式从肠道吸收，过量烟酸以 N-甲基烟酰胺形式由尿排出。

在细胞浆中烟酸盐与5-磷酸核糖-1-焦磷酸反应，糖基化成为烟酸单核苷酸(NMN)；然后再与 ATP 反应成脱酰胺烟酰胺二核苷酸 (deamidonicotinamide dinucleotide)，即脱酰胺-NAD⁺；然后再由谷酰胺提供氨基，形成烟酰胺二核苷酸(NAD⁺)辅酶。NAD⁺ 嘌呤核苷酸2- 位核糖羟基，被磷酸化而生成的另一种烟酰胺辅酶，称为烟酰胺二核苷酸磷酸(NADP⁺)。NAD⁺ 的形成过程如228页所示：

NAD⁺ 和 NADP⁺ 是许多脱氢酶的辅酶。其作用机制是：它们的烟酰胺环作为一个电子阱，负责酶催化的氧化还原反应。在氧化还原反应中，其吸电子情况示于下式：





脱氢酶种类不同则所需辅酶也不同，有些需 NAD^+ ，有些需 NADP^+ ，有些则两者都可用。

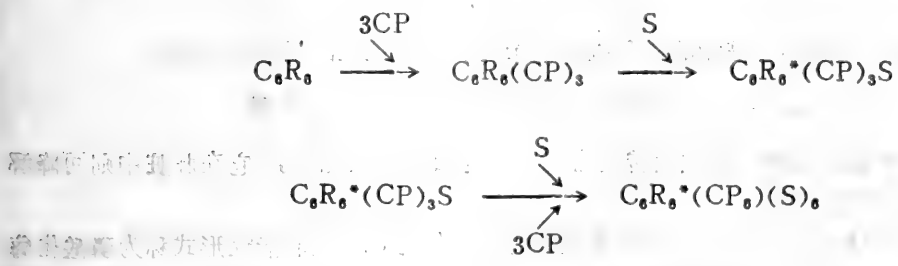
缺乏烟酸，则由癞皮病而伴生的皮肤炎、腹泻、痴呆症等迅速显现，但与癞皮病相联系的代谢失常则难以确定，因为缺乏烟酸常伴随着其它多种维生素的缺陷和其它疾病。

烟酸过多会使皮肤发红、发痒、肠胃不适，有时则有降低血清胆固醇的功能，但烟酰胺过多则无这些现象产生。

则曲线亦向左移。因此 ATP 和 CTP 竞争酶上相同的调节部位。

有证据表明 ATC_{ase} 有两种构象形式。在底物存在下它以松弛状态即 R 态存在，而当 CTP 存在下则以紧密状态或 T 态存在。酶中 32 个—S—S—基，在氨甲酰磷酸和底物类似物琥珀酸同时存在下比它们不存在或只有一个底物存在时能更快地与汞化合物反应。CTP 则降低汞与—S—S—基的反应速度。这就是说在 R 态，酶具有松弛构象，它使—S—S—基变得更敏感。此外，当氨甲酰磷酸和琥珀酸存在时测得酶的沉降系数比 CTP 存在时降低了 4%。由于在这些条件下酶不会解离，沉降系数值之所以有差异，可认为是由于 R 态更不对称，具有一增大的摩擦系数造成的。

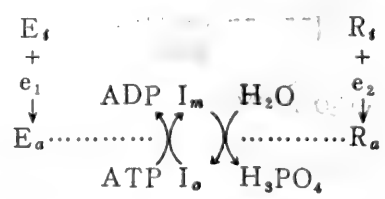
在琥珀酸不存在时，天然 ATC_{ase} 只能结合三分子氨甲酰磷酸 (CP)，但当琥珀酸存在时，则可结合六分子氨甲酰磷酸。这可认为 ATC_{ase} 有同促正协同效应 (如下式)。下式中 C_6R_6 代表天然酶中的六个催化亚基和六个调节亚基，S 代琥珀酸， $C_6R_6^*$ 代表酶的松弛态。从上式可知 CP 的结合没有协同性。一旦琥珀酸结合到 ATC_{ase} 上以后，就会使酶上的 CP 结合部位都结合上 CP，而且琥珀酸也全部协同地结合上去。



二、级联系统共价修饰调节酶

酶活性的调节也可通过共价修饰和非共价修饰酶之间的循环互变而达到。修饰或脱修饰可通过转变酶 (converter enzyme) 而实现，它们与修饰酶、非修饰酶以及它们的效应剂一起形成一个级联系统。共价修饰酶可比非修饰酶更活泼或更不活泼，或者两种形式对效应剂可能有不同反映。

最简单的级联系统为单环系统，其运转如下式。



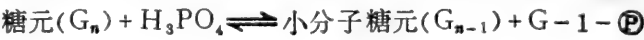
这是一个通过磷酸化而共价修饰的一类酶形式。一个无活性的转变酶 E_i 被专一性别构效应剂 e_1 活化成有活性的转变酶 E_a ，从而启动级联反应。 E_a 在 ATP 参与下，旋即使非修饰酶 I_o 磷酸化，生成修饰酶 I_m 。这一过程是可逆的，它在第二种转变酶 R_a 的催化下， I_m 又可水解脱去一个磷酸而重新生成 I_o 。这个转变酶 R_a 是由无活性的 R_i 经第二种别构效应剂 e_2 作用后活化而成的。不同的单环级联可偶联成二、三或多环级联系统，从而使它对效应剂

浓度更为敏感，使连锁的代谢途径中的底物和产物的回流迅速得到调节。大部分代谢途径的级联调节功能是保持 I_o 和 I_m 两种互变酶形式的稳态浓度，以保证整个代谢中各代谢物的回流。

级联系统调节反应速度的方式有：①级联反应可增强信号，只要利用极少量的转变酶 (E_a 或 R_a) 即可导致大量修饰酶 (I_m) 或非修饰酶 (I_o) 间的互变；②级联反应利用饱和 e^1 使 I_m 的敏感性调整到最大幅度；③级联反应能通过改变效应剂浓度来调整修饰作用的灵敏度；④级联反应作为一个集中系统能灵敏地感知细胞中代谢物浓度在分钟范围内的变化，从而按需要来调整 I_o 和 I_m 的浓度；⑤级联反应又是一个柔性系统，能对别构刺激显示不同应答；⑥级联反应不是速度的放大器，能反映细胞内代谢物浓度在毫秒内的变化。

一些磷酸化酶中的 Ser—OH、Thr—OH 和 Tyr—OH 参与许多级联反应。已知有 20 余种不同的酶，能进行上述类似的可逆磷酸化反应。这些系统都是利用 ATP 提供能量以保持适量的互变酶来调节反应速度。糖元的合成和降解，胆固醇的生物合成以及氨基酸间的相互转变等过程都是按这种方式来调节的。兹以磷酸化酶催化糖元的合成和降解为例，进行深入说明。

糖元磷酸化酶是肌肉和肝脏中的一种级联调节酶。它所催化的反应如下式：



式中的 $G-1-\textcircled{P}$ 在肌肉中可继续转变为乳酸，为肌肉提供能量。它在肝脏中则可降解为葡萄糖，以维持血糖水平。

糖元磷酸化酶可以两种形式存在，其活性形式称为磷酸化酶 a ，而非活性形式称为磷酸化酶 b 。它们都是二聚体，它们之间的转变是靠两种转变酶来完成的。可示于图 6—45。从图中可

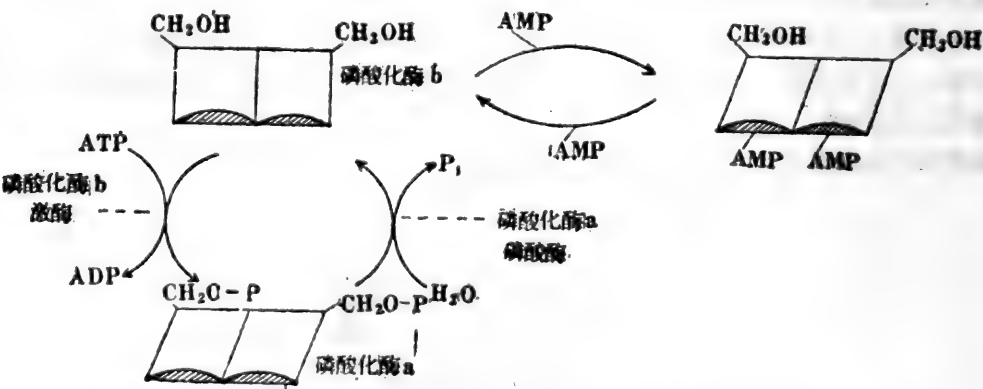


图 6—45 糖元磷酸化酶的存在形式及其级联反应示意图

以看出，肌肉和肝脏中糖元的降解是通过磷酸化酶活性形式和非活性形式比例的变化来调节的。这两种酶形式中 a 形式为 b 形式磷酸化共价修饰而成，两者在四级结构上有区别，因而活性部位结构亦有不同，所以催化活性也不同。

另外，磷酸化酶也可通过非共价结合一些效应剂分子而调节。如磷酸化酶 b 虽无催化活

或从其它高能键供能，反应见代谢各章节。

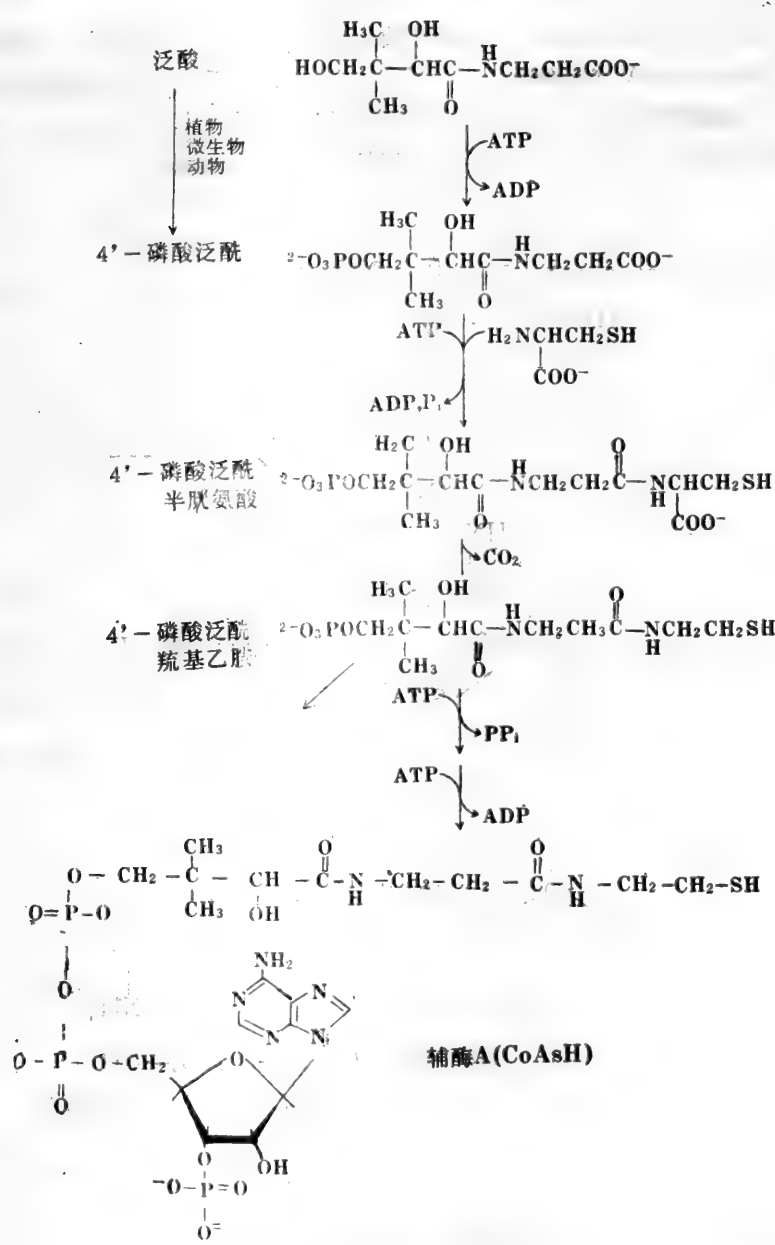


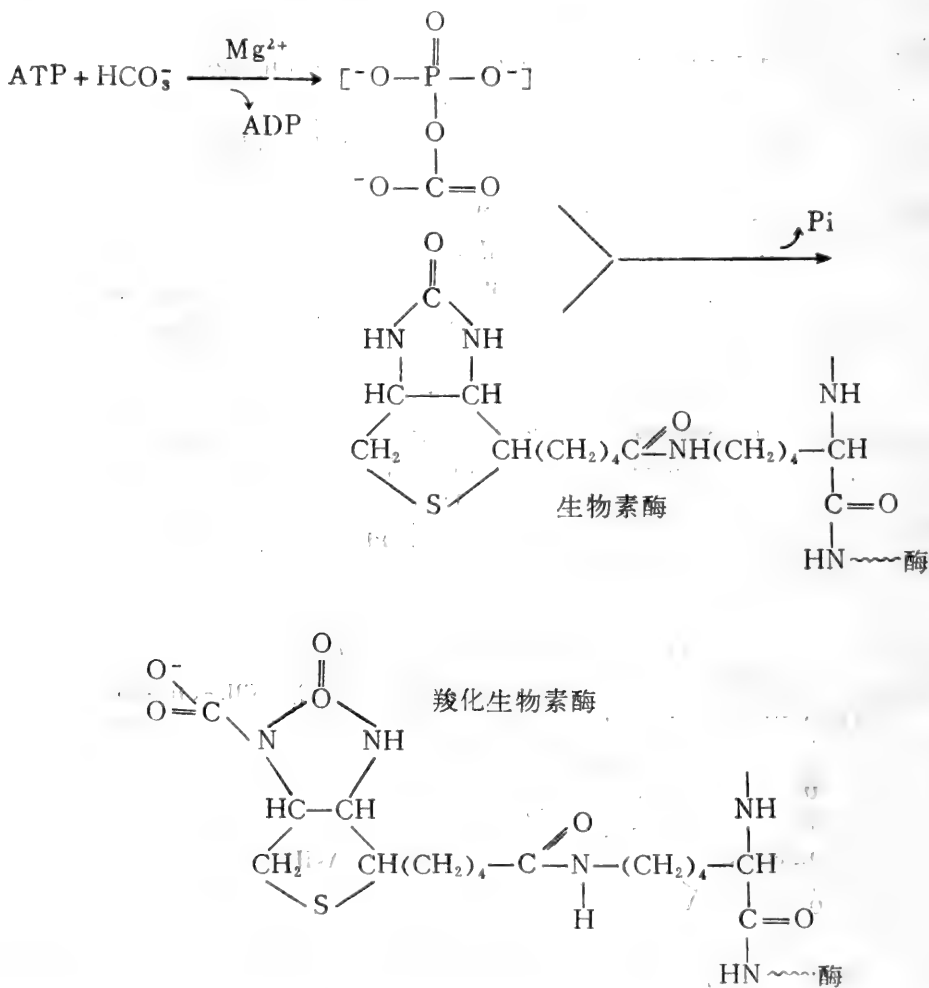
图5—3 泛酸形成CoA的全过程

六、生物素(Biotin)

生物素是咪唑吡啶的衍生物。广泛分布于天然食品中，但各食品中的生物素利用率有很大差异。蛋黄、动物组织、蕃茄、酵母是生物素的优质来源，卵白中则含有抗生物素，能与生物素紧密结合，阻止它从肠壁吸收而导致生物素缺乏。人需要的生物素大部分是由肠

中微生物供给。从尿中或粪便中排出的生物素量都大大超过食物的供给量。所以使用抗菌素药物过量，会使肠道中微生物减少，往往导致生物素的缺乏。

生物素作为专一性多亚基酶（如丙酮酸羧化酶、乙酰—CoA 羧化酶、丙酰—CoA 羧化酶、 β -甲基巴豆酰—CoA 羧化酶等）的一个组分催化羧化反应。生物素辅基与酶蛋白的某赖氨酸 ϵ -NH₂ 以酰胺键结合。在丙酮酸羧化酶所催化的反应中，第一步是一个羧酸根离子结合到生物素的咪唑基 N-1 上，产生活化中间物——羧化生物素。



活化的羧基然后从羧化生物素酶中间物转移到丙酮酸上，形成草酰乙酸和生物素全酶。

生物素和酶蛋白间的长柔性臂，使生物素辅基能从多亚基酶的一个活性部位转移到另一个活性部位。

有一个酶称为羧化酶全酶合成酶，负责把生物素结合到所有羧化酶的酶蛋白上。当该酶不存在时，则需生物素羧化酶的底物就会累积。如乳酸、 β -甲基巴豆酸、 β -羟基异戊酸等即可在尿中检出。婴儿缺此合成酶，则显现皮炎、生长迟缓、秃发症和失去肌肉控制等，有些情况会发生免疫缺陷症。目前尚未发现生物素过多症。

七、维生素 B₁₂ (钴胺素) (Cobalamin)

此化合物是钴啉环衍生物。类似卟啉类化合物,但其中有两个吡咯环是直接相连的,因而不同于卟啉环。钴啉环中心是一个钴离子,它有六个配位,除四个与吡咯—N 配位外,有一个和苯骈咪唑的一个 N 配位,第六个配位体可以是不同的基团,从而获得不同的钴胺素衍生物。钴胺素 (Cyanocobalamin) 第六个配位是一个 —CN 基,是最稳定的钴胺素形式,它可从发酵产生,溶于水,对热稳定。但在活体内必需除去 —CN 基才能转变成活性形式。在动物肝脏中钴胺素以甲基钴胺素、羟基钴胺素和腺苷基钴胺素等形式存在,即以甲基、羟基、腺苷基等占据第六个配位。维生素 B₁₂ 辅酶通式如图5—4。

X 可代表 —CN —CH₃ —OH 5'-脱氧腺苷

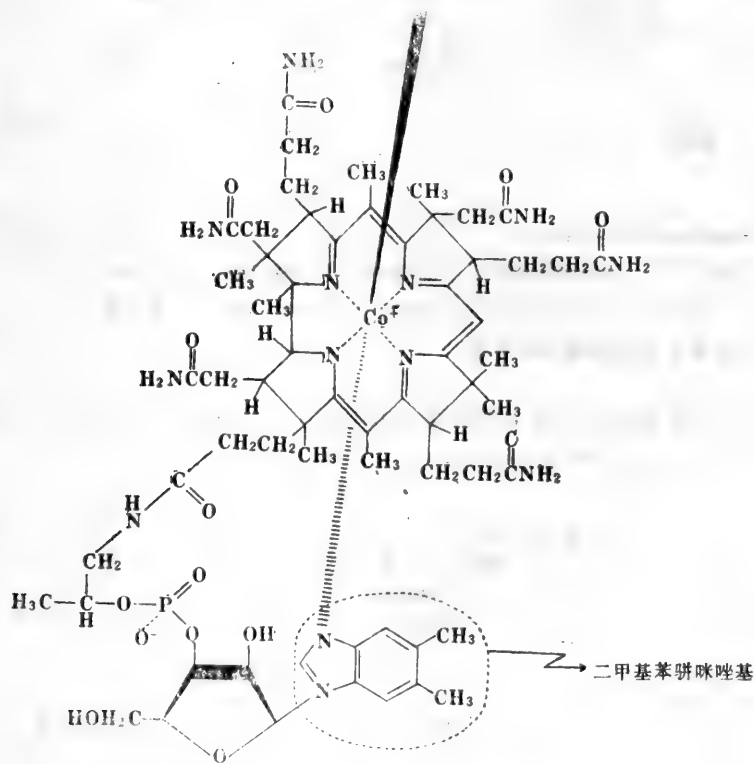


图5—4 维生素 B₁₂ 结构通式

X 代表第六个配位体可为: —CN、—OH、
—CH₃ 或 5'-脱氧腺苷基等。

维生素 B₁₂ 由肠部吸收,由回肠中一受体部位传递,钴胺素必需与一高度专一的糖蛋白内在因子结合,该因子由胃粘膜细胞分泌。另一种钴胺素结合蛋白存在于食物和唾液中,称为 R-蛋白。在正常状态下,它会被胰脏的蛋白酶水解,而在胰脏病变时,钴胺素常不从 R-蛋白上释放,而结合于内在因子以利正常吸收。

随着钴胺素——内在因子跨过回肠膜，内在因子即释放， B_{12} 转移到血浆运输蛋白——运钴胺素 I。另一种钴胺素结合蛋白为运钴胺素 II，存在于肝中，是水溶性维生素唯一的贮藏形式。钴胺素在胆中分泌，参与肝肠循环，当肝肠循环发生混乱时，对外源钴胺素的需要将增加。所以钴胺素辅酶常用作肝炎药物。在肝脏中，腺苷钴胺素占70%，甲基钴胺素只占3%，而在血浆中则以甲基钴胺素为主，有少量羟基钴胺素。

运钴胺素 II 复合物结合于细胞表面专一性的受体，通过内吞作用进入细胞。最后以羟基钴胺素形式释放，在细胞内它又可转变为甲基钴胺素；或进入线粒体，在那儿钴被还原并立即形成 5'-脱氧腺苷钴胺素。全过程示如图5—5。

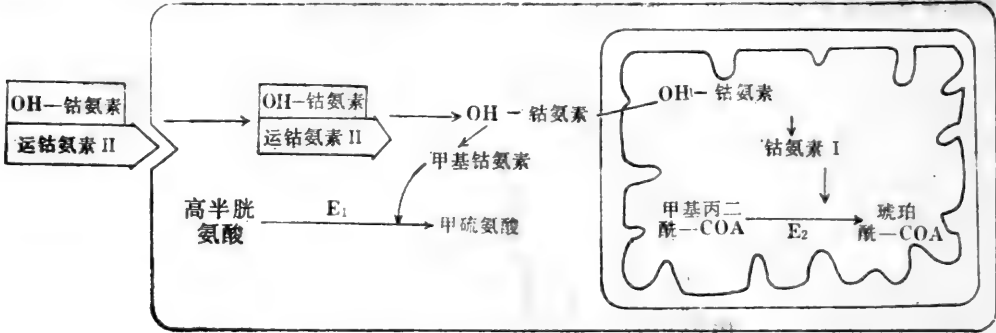
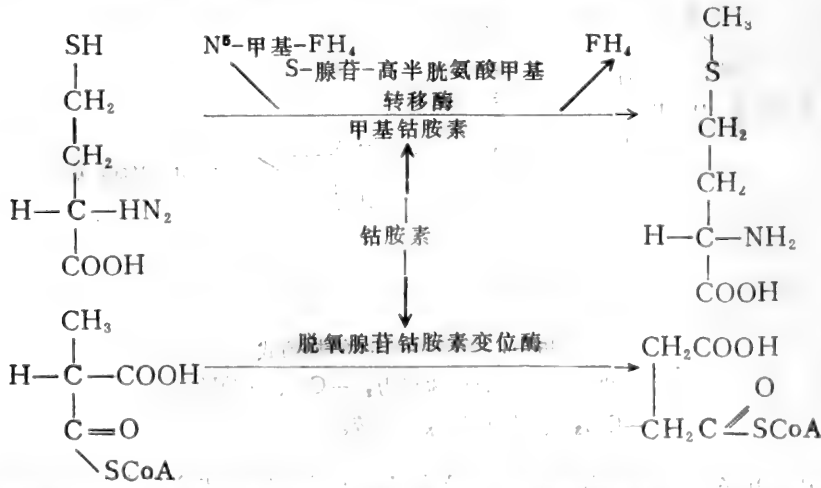


图5—5 钴胺素的吸收在亚细胞中的定位及钴胺素有关的酶
 E_1 为 S-腺苷-高半胱氨酸转甲基酶， E_2 为腺苷钴胺素变位酶。
 钴胺素 I 为脱氧腺苷钴胺素。

在人体内以钴胺素作为辅酶可参与两种酶促反应，即高半胱氨酸甲基化成甲硫氨酸和 L-甲基丙二酰—CoA 异构化成琥珀酰—CoA。反应及所需辅助因子如下：



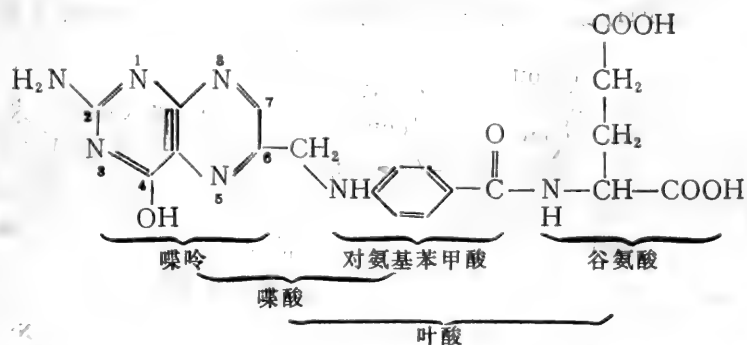
前者是钴胺素先与甲基转移酶结合， N^5 -甲基- FH_4 是甲基供体，将甲基转移到钴胺素辅酶上，随即又从甲基钴胺素辅酶上转到高半胱氨酸上，产生甲硫氨酸。后者则以腺苷钴胺素作辅酶。

由于钴胺素缺乏、吸收不良或运输阻碍而造成的钴胺素缺乏症都会导致高半胱氨酸尿和甲基丙二酸尿。

人体已发现四种与钴胺素代谢有关的遗传混乱病。其中两种只影响脱氧腺苷钴胺素的合成，而另两种患者则无能力合成腺苷钴胺素或甲基钴胺素。

八、叶酸 (Folate 或 Folacin)

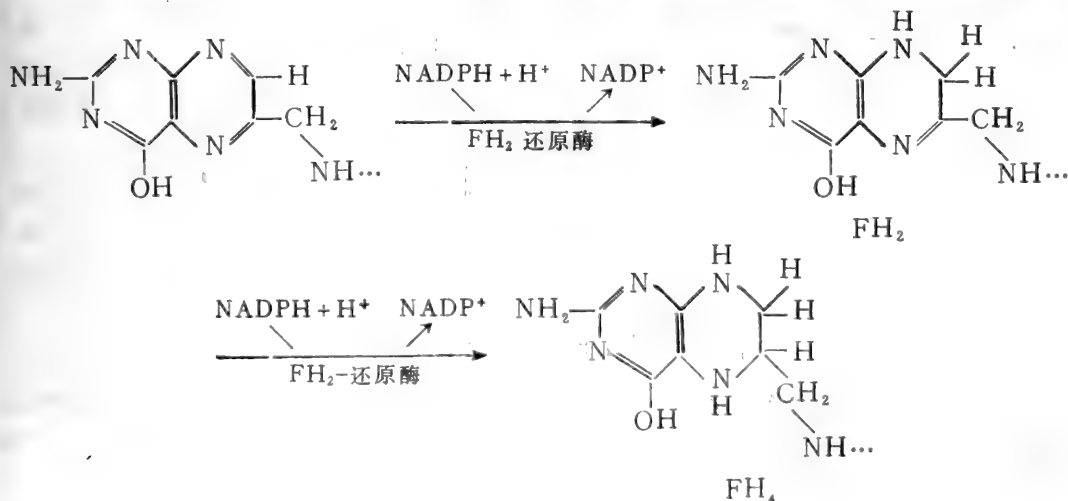
叶酸具有下式结构：



动物不象植物和微生物，不能合成对氨基苯甲酸，也不能使喋呤与谷氨酸结合，所以不能合成叶酸，叶酸必须由食物供给。其主要来源是绿叶蔬菜。在植物中，叶酸与不寻常的 γ -谷氨酰键合而成的七肽结合，在动物肝中则与谷氨酰五肽结合，这不寻常的 γ -谷氨酰键，对肠中经常存在的蛋白酶的水解作用有抗性。但它却可被专一性的肠酶——叶酰聚谷氨酸水解酶水解。叶酰七谷氨酸水解后成为叶酰单谷氨酸，只有它才能被肠壁吸收。在肠细胞内叶酰部分还原成四氢叶酸(FH_4)，并甲基化成 N^5 -甲基- FH_4 作为吸收过程的主要部分。正常人不管口服什么形式的叶酸，都会使血清中 N^5 -甲基- FH_4 浓度上升。

在血浆中2/3的 FH_4 结合于一蛋白质上，当其浓度超过 $10\mu\text{g/l}$ 时，通过肾小球过滤的叶酸只有小部分被肾小管重新吸收。大部分分解，并从胆汁排出。

叶酸还原成 FH_4 后，即可作为不同氧化还原态一碳单位的载体分子。叶酸的还原是由



二氢叶酸 (FH_2) 还原酶以 NADPH 作氢供体催化而进行的。氨甲喋呤抑制剂对微生物或哺乳类细胞的 FH_2 -还原酶的结合比其天然底物更紧密。因此这叶酸拮抗物可作为治疗病毒及肿瘤的重要药物。

FH_4 可载荷的一碳基团有甲基、次甲基、甲川基、甲酰基、甲酰亚胺基等，在代谢上它们都可相互转变。这些一碳组分主要来自丝氨酸。丝氨酸将其羟甲基转移到 FH_4 上产生 N^5 、 N^{10} -甲撑- FH_4 (见图5-6反应1)。此物在 FH_4 代谢中起着中心作用，它可还原成 N^5 -甲基- FH_4 (见图5-6反应2)，然后脱氢成 N^5 、 N^{10} -甲川- FH_4 (图5-6反应3)，继续水合而成 N^{10} -甲酰- FH_4 或 N^5 -甲酰- FH_4 两种异构体 (图5-6反应4和5)。

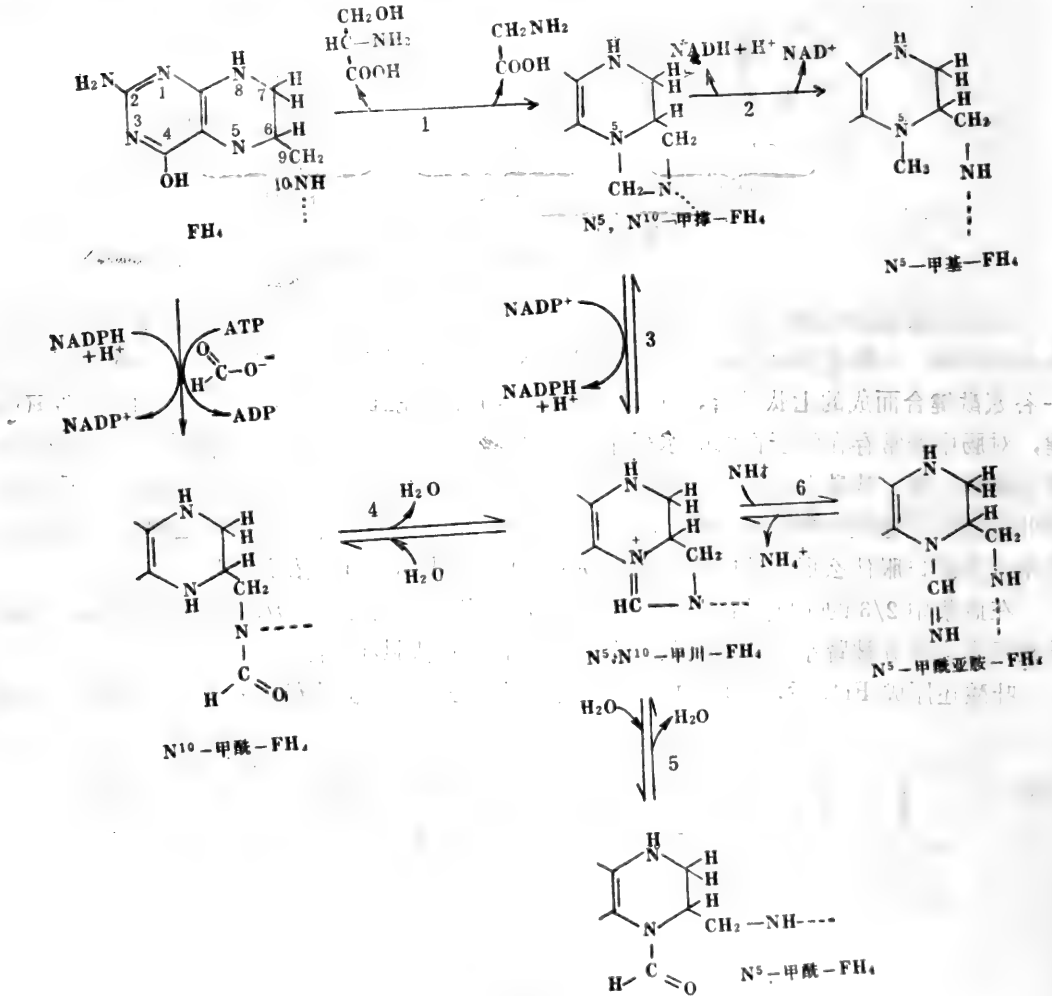


图5-6 FH_4 上各一

FH_4 各衍生物的功能多种多样。如 N^5 、 N^{10} -甲撑- FH_4 可提供甲基给脱氧尿苷酸用于合成胸苷酸 (见核苷酸代谢)。 N^5 -甲基- FH_4 可作为甲基供体合成甲硫氨酸 (已在钴胺素中介绍)。 N^5 、 N^{10} -甲川- FH_4 可提供一碳原子合成嘌呤 (8-位碳)，而嘌呤的 2-位

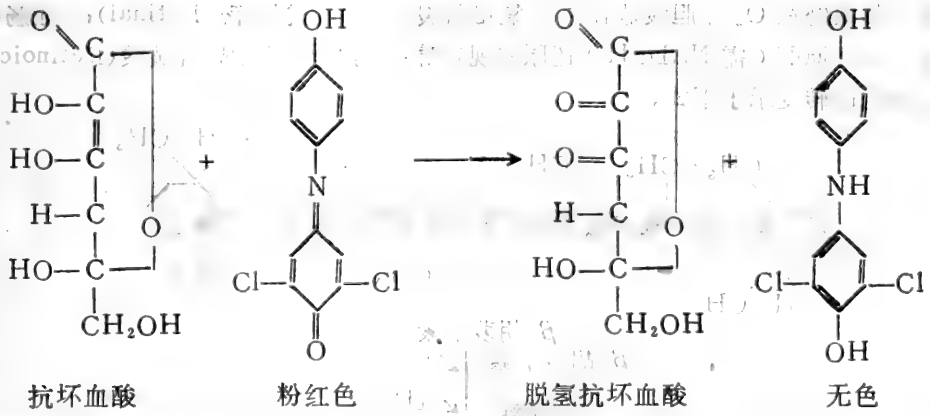
位碳则由 N^{10} -甲酰-FH₄ 提供 (见嘌呤合成代谢)。 N^5, N^{10} -甲撑-FH₄ 也可提供一个 $-CH_2OH$ 给甘氨酸以合成丝氨酸 (图5—6反应的逆反应)。

由于叶酸和钴胺素代谢之间的关系非常密切, 因此缺乏它们中任一种, 都会导致巨红细胞贫血症。医药上要区别由哪一种缺乏而引起是相当困难的。但患者如果确实缺叶酸, 则每小时服 300-500 μ g 即呈现正常血液反应, 而这样小剂量对缺维生素 B₁₂ 的恶性贫血患者无影响。从而可判断两者究竟何者缺乏。

九、维生素 C

维生素 C 具糖酸内酯结构。由于它含烯醇羟基而带酸性, 故又名抗坏血酸。在空气中可自动脱去两个氢原子而氧化成脱氢抗坏血酸。两者都存在于体液中, 都有生理活性。

抗坏血酸的最佳来源有柑桔、甜橙、草莓、西瓜、蕃茄、青椒以及一些绿叶蔬菜等。它对热不稳定, 在痕量金属(如铜)存在下更不稳定, 但在冰冻条件下和酸性溶液中较为稳定, 而在碱性溶液中则易失活。抗坏血酸可还原2,6-酚靛酚染料使之退色, 故常用此法以定量测定抗坏血酸。



人、猿、豚鼠等高等或较高等动物不能自己合成抗坏血酸, 必须由食物供给, 由肠部吸收。在正常状态下, 它能在体内贮藏, 不会很快耗尽, 约3—4月不进食抗坏血酸, 才能导致维生素 C 缺乏症。植物和动物中存在维生素 C 的浓度远比其它水溶性维生素大。例如人血浆中维生素 C 的浓度为 1mg/100ml。

维生素 C 的功能是多方面的。它是还原剂, 氧化还原电位为 +0.087V, 能还原许多化合物, 如 O₂、NO₃⁻、细胞色素 a(cytaaFe³⁺)、细胞色素 C(cytcFe³⁺)、甲基丙二酰-CoA、高铁血红蛋白等, 但不能还原 NAD、丙酮酸、乙酰乙酸等。体内酪氨酸分解代谢需要维生素 C 存在。

在胶原中脯氨酸羟化需要抗坏血酸促进脯氨酸羟化酶的活性, 催化羟脯氨酸的合成。而羟脯氨酸是维持胶原蛋白四级结构的关键物质, 维生素 C 有促进愈疮的功能, 可能与促进胶原生物合成有关。

抗坏血酸可与其它氧化还原体系偶联起来而起作用。如它可与谷胱甘肽、细胞色素 C、吡啶核苷酸或黄素核苷酸等偶联。肾上腺皮质含有大量维生素 C, 当腺体被促肾上腺皮质

激素刺激时，维生素 C 便迅速耗尽，其作用尚待进一步研究。

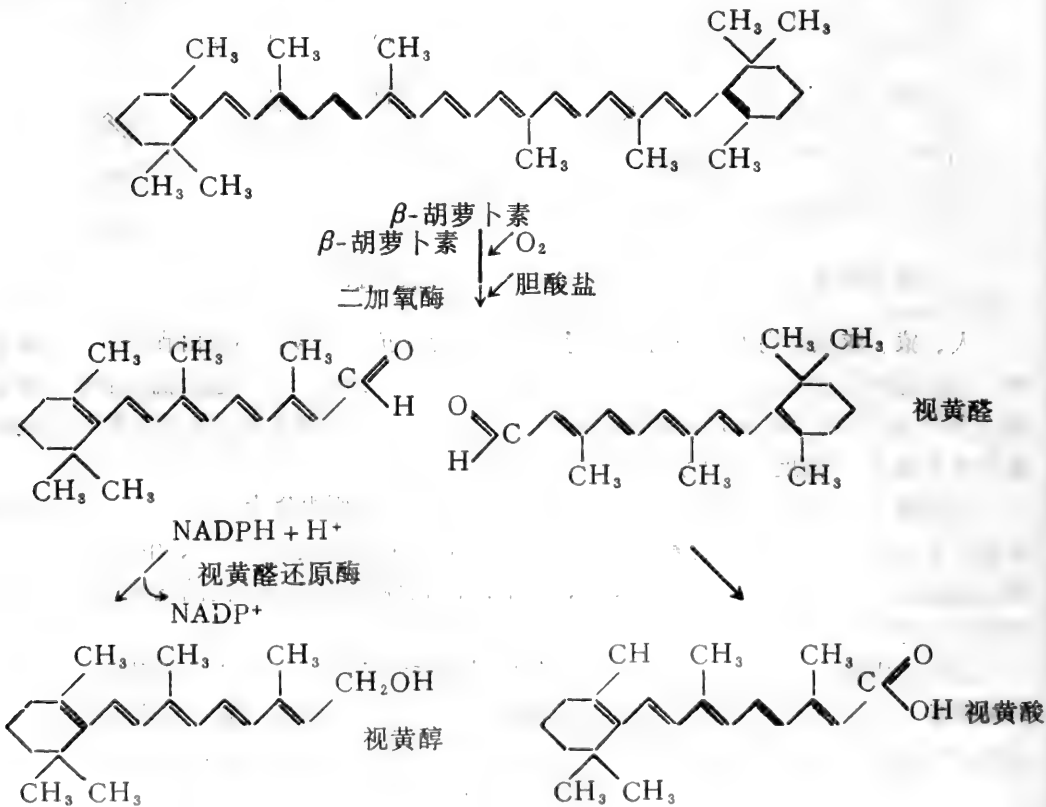
第二节 脂溶性维生素

脂溶性维生素大部分是异戊二烯聚合物或衍生物。同脂肪一样，都属非极性疏水分子，在体内以与食物脂肪同样的方式被肠胃系统吸收和运输。脂溶性维生素一旦被吸收，即呈乳糜微粒，运入肝中。它们可贮藏于肝（如 A、D、K）或脂肪组织中（如 E）。这类维生素可被脂蛋白或专一性结合蛋白在血液中运输。有些脂溶性维生素更象激素，如维生素 D。

一、维生素 A 或类视黄醇 (Retinoids)

这是一类含有一个己烯环的异戊二烯聚合物。近年来用类视黄醇这名词来表示天然视黄醇和其合成类似物，它们都具视黄醇功能。所以维生素 A 可定义为视黄醇及其类似物。

在动物产品中维生素 A 一般以视黄醇及其长链脂肪酸酯的形式存在。而在植物产品中则以维生素 A 原形式存在，如胡萝卜素。前者在肠腔水解由肠直接吸收。 β -胡萝卜素则被 β -胡萝卜素二加氧酶在 O_2 和胆酸盐存在下氧化断裂成两分子视黄醛(Retinal)，在肠粘膜上它又被专一性还原酶（需 NADPH）还原成视黄醇，有少量氧化成视黄酸(Retinoic acid)。它们在肠内的转变示于下式。

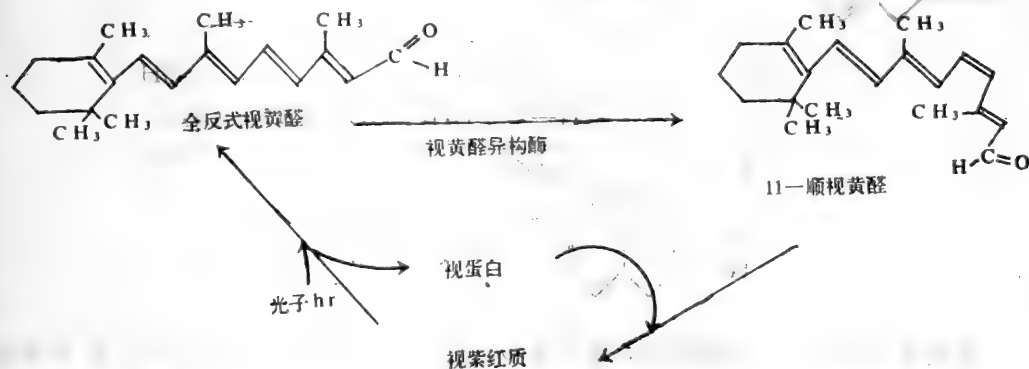


吸收的视黄醇，重新被长链脂肪酸酯化，通过淋巴乳糜微粒，进入血流中。到达肝细胞

后, 这个酯被水解, 然后重新被软脂酸酯化, 贮藏于肝的脂小滴中。动用时该软脂酸酯水解成视黄醇并结合到在肝细胞中合成的脱辅基视黄醇结合蛋白上。这复合物称为全视黄醇一结合蛋白, 然后立即进入循环, 在靶组织释放出视黄醇。该脱辅基蛋白也能与视黄醛和视黄酸结合。全视黄醇-蛋白对前清蛋白有高亲和力, 它们形成的复合物同时可载甲状腺素。到达视黄醇靶细胞时, 把视黄醇留下。

三类视黄醇各具有其独特功能。视黄醇似乎可作为一种激素, 当它达靶细胞时, 就迅速地结合到细胞视黄醇结合蛋白(cellular retinol binding protein, CRBP)上。这个结合蛋白与血清中的不同, 它在细胞中不是运输视黄醇, 而是专一性地结合于视黄醇上, 类似细胞内固醇激素受体分子的功能。视黄醇所发挥的繁殖分化等功能, 就与其固醇激素功能有关。

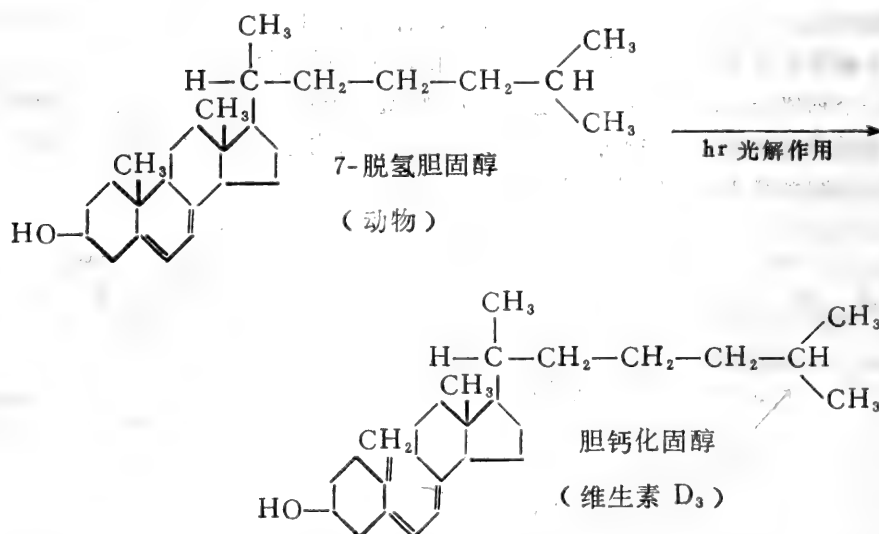
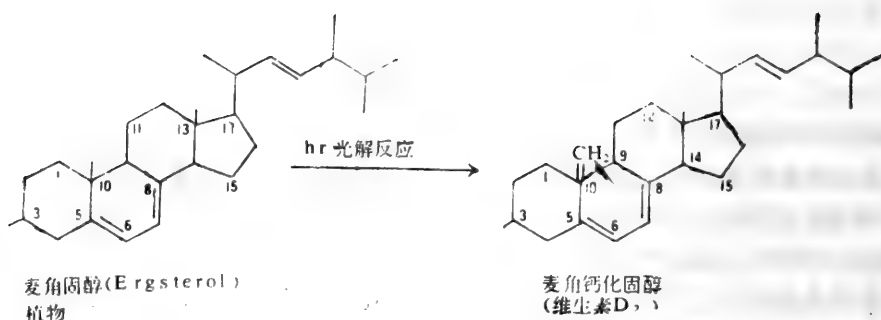
视黄醛作为一个视色素——视紫红质组分在视网膜杆状细胞中起作用。该细胞中一个全反式视黄醛的异构体——11-顺视黄醛, 专一性地结合于视蛋白上成为视紫质。当视紫质曝光后, 随着它的褪色而解离成全反式视黄醛和视蛋白, 这个反应伴随视蛋白构象变化, 在细胞膜上诱发出一个钙离子通道, 使钙离子迅速注入, 触变一个神经脉冲, 使脑感光。但视紫质吸收光子而成全反式视黄醛后, 并不能完全逆转为顺式, 因此为了视觉不断保持, 必须从食中不断摄取全反式视黄醛来补充它的不断地损失。



视黄酸没有上述视黄醇对繁殖分化等具有的激素功能, 也没有视黄醛作为视色素组分的功能。它常磷酸化成磷酸化视黄酸, 作为专一性寡糖的异戊二烯载体, 参与糖蛋白的合成。寡糖视黄酰磷酸是微粒体系统的一副产物, 它多半利用聚异戊烯衍生物多萜醇硫酸酯作载体。近年来已提出视黄酰磷酸作为寡糖载体, 跨过细胞膜的类脂双层是通过酶促顺反异构化作用而完成的, 这类似于视紫质中视黄醇的异构化。动物试验证明, 维生素 A 缺乏则能使结合于肝糖蛋白上的甘露糖量降低 8%, 这也充分说明视黄酸在糖蛋白合成中起重要作用。许多组织含有一种细胞内蛋白质, 能结合视黄酸, 称为视黄酸结合蛋白 (CRABP), 它对视黄醇和视黄醛无亲和力。它与上述 CRBP 在组织中的分布亦不同。

二、维生素 D

维生素 D 是一个真实的固醇型原激素。主要存在于动物中, 也存在植物及酵母中。维生素 D 是由维生素 D 原——麦角固醇、7-脱氢胆固醇经光解而产生的。

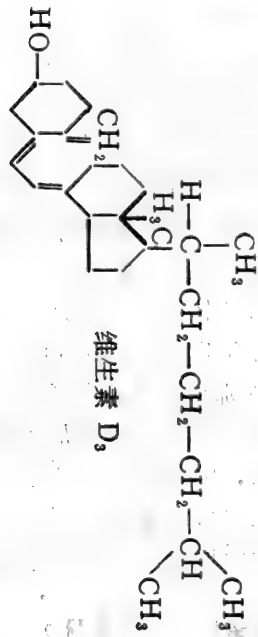


维生素 D₂和 D₃是活性最高的维生素 D。它们生理活性相等。人的维生素 D 的主要来源一是由食物供给、二是由皮肤中的7-脱氢胆固醇在日光照射下经光反应而生成。食物中的维生素 D₂和 D₃与肠中的微团混合，经近端的小肠吸收，与专一性球蛋白结合，经血流运至肝脏。在肝脏中 D₃被专一性 D₃-25-羟化酶在 25-位上羟化，此反应在肝微粒体中进行，其作用受25-羟化 D₃水平调节，25-羟化 D₃是维生素 D 的主要贮藏形式，也是循环中维生素 D 的形式。肝肠循环失调，就会导致维生素 D 缺乏。

25-羟化 D₃能被肾小管和胎盘中一种线粒体酶—25-羟化 D₃-1 α -羟化酶进一步在 1-位上羟化成为 1,25-二羟化 D₃，这是一个最有效的维生素 D₃的代谢物，也是维生素 D 的唯一天然存在形式。它的生成受甲状旁腺激素、血清磷酸和其本身的浓度调节。

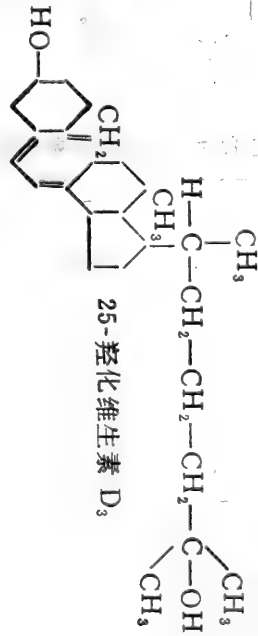
25-羟化 D₃也能被肾小管、软骨、肠和胎盘中一种线粒体酶在 24-位羟化成 24,25-二羟化 D₃。

在血清中24,25-二羟化 D₃的水平与1,25-二羟化D₃水平有相反关系。事实上，在正常血钙水平下，二者浓度几乎相等。低钙症诱导甲状旁腺分泌更多的甲状旁腺激素，旋即增加 1 α -羟化酶的活性，产生更多的1,25-二羟维生素 D₃。同时甲状旁腺素降低24-羟化酶活性，因而

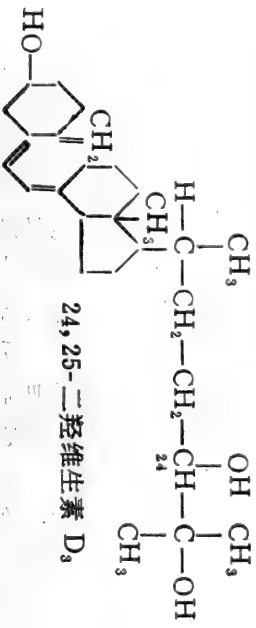
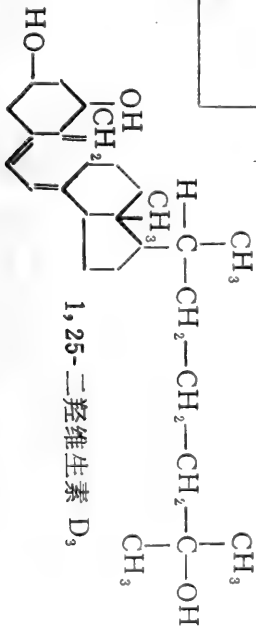


维生素D₃

肝25-羟化酶

25-羟化维生素D₃

1α-羟化酶

24,25-二羟维生素 D₃

1,25-二羟维生素 D₃

减少 24,25-二羟维生素 D₃ 水平。1,25-二羟维生素可增加肠对钙的吸收,并增加肾脏和骨对钙的重吸收,这样又使血钙水平渐趋正常化,反过来又降低甲状旁腺分泌和 1 α -羟化酶活性,同时增加24-羟化酶活性。因此1,25-二羟维生素 D₃ 和 24,25-二羟维生素 D₃ 的水平与甲状旁腺素水平密切相关并间接地与血清钙水平有关。因此维生素 D₃ 是钙代谢的调节因子。

低磷时,直接刺激1,25-二羟维生素 D₃ 的合成,而 1,25-二羟维生素 D₃ 又反过来增加肠部对磷的吸收。所以血清磷的水平既受维生素 D 的调节,相反,它又能调节维生素 D 的水平,从而调节血钙的水平。

1,25-二羟维生素 D₃ 的作用机制,类似固醇激素,其靶细胞有肠、骨和肾。它到达肠细胞时,即结合于专一性的细胞质受体分子,形成 1,25-二羟维生素 D₃-受体复合物,然后转移到核中,在那里影响一个肠钙结合蛋白的合成; 而该蛋白又是肠内吸收钙的必需因子。1,25-二羟维生素 D₃ 也能增加肠磷的吸收,但机制尚不清楚。1,25-二羟维生素 D₃ 能影响骨胶原的交联,因而影响组织的矿化。

24,25-二羟维生素 D₃ 也能增加肠钙吸收, 但降低血清 磷钙浓度, 促进骨的正常矿化以及矿化骨和软骨钙化所需羟基磷灰石的合成。

三、维生素E (α-生育酚)

维生素 E 存在于植物油中,以麦胚、稻米、棉籽中含量多。它是 高等动物受精所必需。自然界中具维生素 E 活性的物质已知有八种, 其中主要者如表 5-1, 它们的通式为:

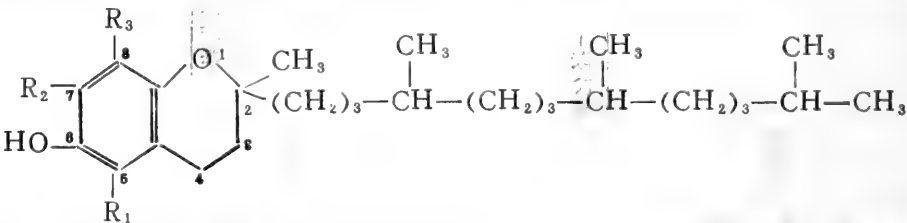


表5—1 各种生育酚及其结构中各取代基的类型

生育酚种类	R ₁ ⁻	R ₂ ⁻	R ₃ ⁻
α	CH ₃ ⁻	CH ₃ ⁻	CH ₃ ⁻
β	CH ₃ ⁻	H ⁻	CH ₃ ⁻
γ	H ⁻	CH ₃ ⁻	CH ₃ ⁻
δ	H ⁻	H ⁻	CH ₃ ⁻
ξ (Zeta)	CH ₃ ⁻	CH ₃ ⁻	H ⁻
η (Eeta)	H ⁻	CH ₃ ⁻	H ⁻

从上述通式可知生育酚都是聚异戊二烯取代的6-苯基骈吡喃衍生物。其中以 α-生育酚活性最高,在自然界分布最广。虽未证实维生素 E 是人类受精所必需,但人体缺乏它,则严重损害肠脂肪的吸收,出现肌肉软弱,肌酸尿和红细胞易碎等现象,服用 维生素 E 后症状消失。α-生育酚易从小肠吸收,以乳糜微粒运到肝中并以脂蛋白形式释放到周围组织中。线粒体、内质网和质膜的磷

脂对α-生育酚具有专一的亲和力,维生素 E 似在这些细胞器中被浓缩。

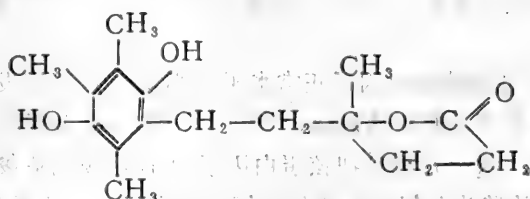
维生素 E 的功能是作为最强烈的天然脂溶性抗氧化剂并与硒协同作用。

在血浆脂蛋白和细胞器磷脂中的维生素 E 水平, 决定于四种因素: ①摄取的 α-生育酚量, ② 食物中原有氧化剂和抗氧化剂水平: ③食物中硒的含量; ④食物中含硫氨基酸的摄

入。

在动物对付细胞和亚细胞膜磷脂的过氧化作用时，维生素 E 的抗氧化活性是防御第一线。以硒为主要组成的谷胱甘肽过氧化物酶则是第二道防线。这两道使过氧化物在损害膜以前就遭到破坏，从而达到保护这些细胞器、抵抗各种各样疾病、抵抗物理化学环境损伤以及其它压力等目的。

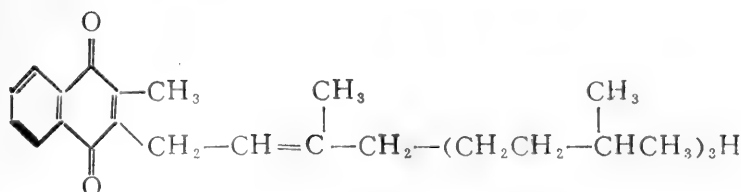
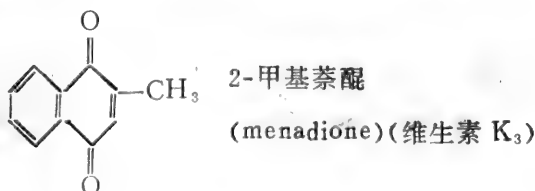
维生素 E 如 α -生育酚的苯骈吡喃环和侧链在体内的氧化产物如下式。该氧化产物的两个—OH 与葡萄糖醛酸结合，并排出体外。



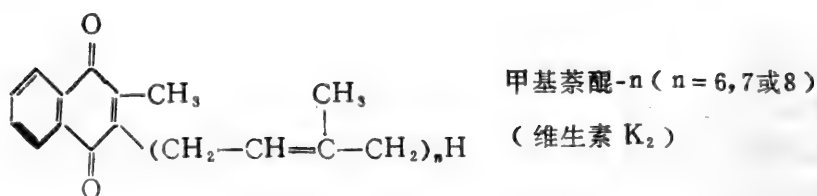
维生素 E 和硒常有互补功能。硒节省维生素 E 用量是因为硒有以下功能：① 硒是维持胰脏功能所必须的，因此它和维生素 E 一样是消化吸收脂肪所必须；② 硒是谷胱甘肽过氧化物酶的组分之一，有助于毁坏过氧化物，因而它可使类脂膜中多烯脂酸的过氧化作用降低，从而大大减少维持膜完整性对维生素 E 的需量；③ 硒能帮助维生素 E 保持在血浆脂蛋白中。同样维生素 E 也能减少活体对硒的需要，它可防止硒在活体内的损失和保持其活性形式，这是由于维生素 E 能阻止膜脂从内部自氧化，因而减少了谷胱甘肽过氧化物酶的负担。

四、维生素 K

维生素 K 是聚异戊二烯取代的萘醌衍生物。具有维生素 K 活性的化合物至少有四种。2-甲基萘醌是该类维生素的母体，它在活体内显示生物活性。叶绿醌是植物中发现的维生素 K 的形式，又称维生素 K₁。甲基萘醌-7 是微生物和动物中所存在的一组维生素 K 中的一员，即维生素 K₂ 中的一员。K₁ 大量存在于植物油、绿叶蔬菜和麦胚中。维生素 K₂ 是由动物肠中的细菌合成的。它们的结构如下：

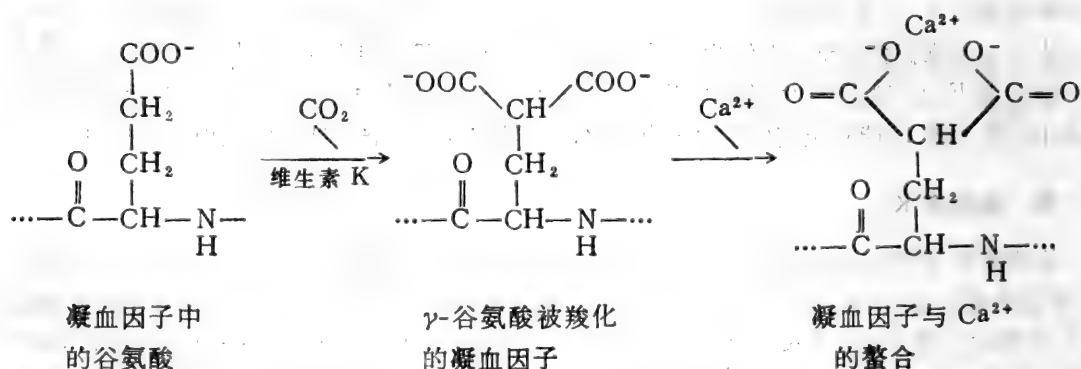


叶绿醌 (phylloquinone, 或 Mephyton)
(维生素 K₁)



从肠中吸收维生素 K，需伴随正常的脂肪吸收，低脂肪吸收症如胰功能障碍、胆汁失调、肠粘膜萎缩等常导致维生素 K 的缺乏。大肠消毒，由于除去了肠中细菌群落，也会导致维生素 K 缺乏。

早已知道，维生素 K 是维持凝血因子正常水平所必须。近年来发现，在肝脏中合成的凝血蛋白因子 I、II、VII 等都是非活性前体，要产生成熟的凝血因子，必需有维生素 K 参加的翻译后的修饰过程，这一过程是把该蛋白因子的谷氨酸残基羧化成 γ -羧基谷氨酸，凝血酶原含有约 10 个这样的羧化谷氨酸。羧化谷氨酸的作用是使该蛋白质通过蛋白质—钙—磷相互作用而螯合。血凝因子中谷氨酸被维生素 K 催化羧化及其羧化产物与 Ca^{2+} 的螯合作用如下式：



从上式可知维生素 K 的主要功能是作为一个羧化酶的辅助因子，该酶能催化专一性蛋

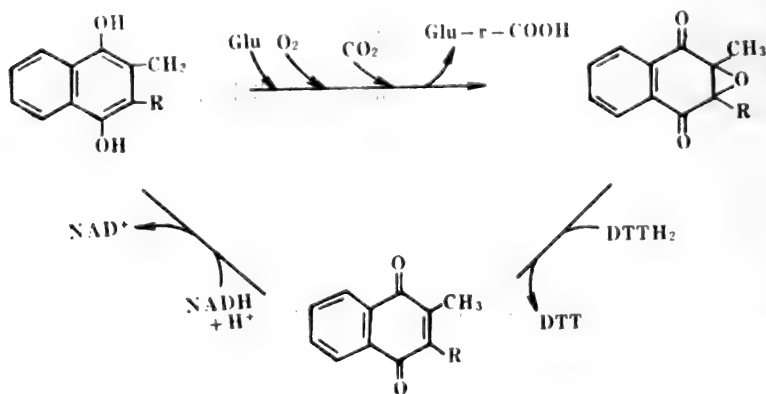
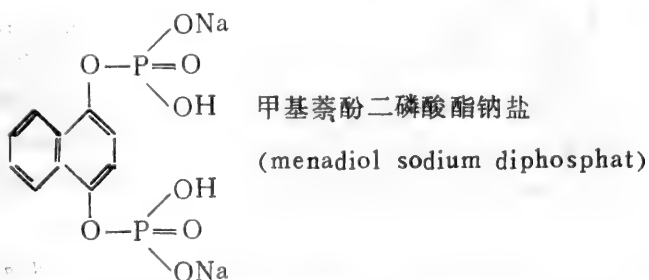
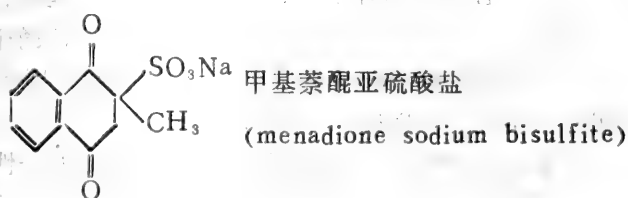
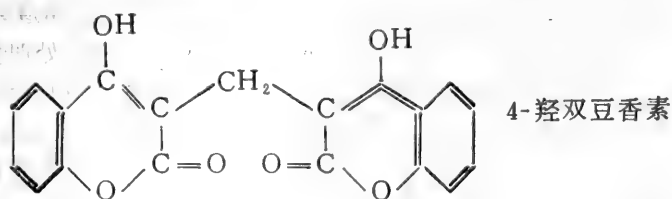


图5—7 肝微粒体中存在的维生素 K 循环图

白质分子中谷氨酸的羧化，形成 γ -羧基谷氨酸。这个羧化反应在微粒体中进行，并需要 O_2 、 CO_2 和维生素 K 的氢醌结构。在肝微粒体中，存在一维生素 K 循环，过程示如图5-7（图中的 $DTTH_2$ 为二硫苏糖醇作还原剂，）从而不断产生活性形式的维生素 K。

4-羟双豆香素是维生素 K 的类似物，能抑制维生素 K 的2,3-环氧化物的还原，所以维生素 K 可作为抗血凝药物 4-羟双豆香素的解毒剂。它的醌型会绕过被抑制的环氧化物还原酶，从而提供活泼的氢醌型维生素 K。为达治疗目的，常服过量维生素 K，也可采用合成的可溶性维生素 K 类似物如甲基萘酚二磷酸酯钠盐和甲基萘醌亚硫酸钠等。这些水溶性维生素 K 类似物，可不经胃肠引入机体，使肝脏迅速制备出活泼的凝血酶原。一些维生素 K 类似物的结构如下：



大量维生素 K 有潜在毒性，如甲基萘醌可引起婴儿的溶血作用和加剧高胆红素症。

第六章 酶

第一节 引言

我国在几千年前的夏禹时代已盛行酿酒，在周代人们就会制糖、做酱，还知道用酒曲治疗消化不良症等。这些实际上就是利用酶的实践活动，但当时并不知道其所以然，还误认为这些作用只有在活体内才能进行。1833年Payen和Persoz用酒精处理麦芽提取物，得到一种热不稳定物质，它能使淀粉转变为糖，当时称它为糖化酵素(diastrase)。这可算第一次对酶存在的认识。接着人们在胃液中又发现了消化食物蛋白的物质，称为pepsin。当时把这类物质总称为酵素，以表示它们与发酵的关系。

在这一系列发现的基础上，Liebig首先提出发酵可由活细胞所提取的非生命物质来进行。但生物学家Pasteur则坚持发酵必须有生命物质参与。随着两派争论的继续进行，酵素这个名称逐渐为Kuhne所倡导的enzyme(酶)这一名称所取代。Bücher成功地从酵母细胞提取物中获得了发酵作用系统，使两派之争就此告终。

十九世纪末，对生物物质的结构知识日益丰富，对酶作用的专一性逐渐了解，E. Fischer提出了酶和其作用底物的有名“锁匙学说”。1926年Summer第一次获得结晶脲酶，接着Northrop又连续分离出结晶胃蛋白酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶，并从动力学角度一再证明酶是蛋白质。到目前为止纯化并结晶的酶已有两三百种，另外约有两千种以上已纯化到不同程度，其中包括早期发现的胞外酶和1937年以后发现的许多胞内酶。由于对酶的知识大量增加，促进了对许多最基本的生命过程的了解，如光合作用、呼吸作用、生物氧化和发酵、生长中许多有机物的合成以及一些机械和渗透过程等，很多都是根据酶的分离和研究而获得阐明的。近年来酶学发展迅速，已出现许多分枝方向，且与生物化学、分子生物学、物理化学等学科紧密联系。在实际应用上，它也越来越重要。医学、发酵工业、分析技术等都和酶学有密切关系。世界各国，许多科学工作者已从不同的角度把注意力集中到酶学研究中来，专门研究酶的研究所已经建立。

根据酶的结构来阐明其催化机制的惊人高效率和专一性是酶学研究中的首要问题。对于结构知识还较缺乏的那一部分酶，它们的动力学研究得到了最快的发展。根据这一方法，已能分析反应次序，从而推导出酶促反应机制。同位素应用，也对酶的作用机制作出了不少贡献。通过酶的抑制作用的研究，对酶的专一性、活性中心结构和催化基团种类及性质的研究，提供了不少有益的成果。

除研究天然酶的结构及其作用机制外，近年来兴起酶工程这一分支领域。它一方面通过化学方法如酶的化学修饰、酶的固定化、人工半合成酶来改造酶，使之更适合于人们需要；另一方面根据以基因重组技术为主的分子生物学原理，大量生产酶、修饰酶基因，以生产突变酶或设计新酶基因，以合成自然界不曾有过的新酶。总之，随着对天然酶结构研究的日趋

进步,加以现代分子生物学技术的应用,不仅酶作用机制会获得迅速阐明,而且改造酶、生产满足人类需要的超自然的优质酶,将指日可待。

第二节 酶的分类、命名及其所催化的反应

在早期,酶名称混乱,有时一酶数名,有时则数酶一名,而且并不反映酶的催化特性。随着酶数量的增加,大多数酶按其作用底物的类型来命名,如淀粉酶、蛋白酶等。进而又在底物名称之前加一些形容词以表示酶的来源或反应条件等。如胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、碱性磷酸酯酶等。后来又进一步把底物名称及酶所催化的反应类型结合起来,构成酶的名称,如谷丙转氨酶、苹果酸脱氢酶、草酸氧化酶等,有些这样的名称已被国际酶学会议推荐采用,作为法定习惯名称。从1961年起,经多次修订,国际上已有了统一的酶系统命名和分类原则,并列成了表。

一、酶的分类原则

在酶系统分类中,每个酶都有一个代号,代号之首以 EC 表示,意即酶学会议。EC 后面由四个阿拉伯数字组成,每个数字用“.”分开,这四个数字含义不同。第一个数字代表酶所属的大类,所有酶分为六大类,即 1. 氧化还原酶类; 2. 转移酶类; 3. 水解酶类; 4. 裂合酶类; 5. 异构酶类; 6. 合成酶或连接酶类。第二个数字表示大类下的亚类,在各大类下的亚类含义不相同,如氧化还原酶类下的亚类表示底物中被氧化基团的类型,如 1.

表示 >CHOH ; 2. 表示 >C(=O)H 或 >C=O ; 6. 表示 NADH 或 NADPH 等。转移酶类下的亚类表示底物中被转移基团的种类,如 1. 表示甲基或其它一碳基团; 3. 表示酰基或氨酰基等。水解酶下的亚类表示被水解键的类型。裂合酶下的亚类表示裂解基团与剩余部分间的连结形式。异构酶类下的亚类表示所催化的异构化作用的类型。连接酶亚类表示两分子连接所生成键的类型(例见附录表)。第三个数字表示大类下的亚一亚类。如氧化还原酶的亚一亚类表示底物中被还原的基团。其它各亚一亚类见附录表。第四个数字是表示亚一亚类下的具体的个别的酶的顺序号。所以只需要从代号前面三个数字,就可清楚地知道一个酶的底物种类和所催化的反应类型。分类和各酶编号见附录。

二、酶的命名原则

六大类酶共同的系统命名原则大致有如下几点:

1. 名称由两个部分构成:前面为底物名,如有两个底物则都写上,并用“:”分开,后面为所催化的反应名称;有时后面还加一些括号把反应或产物性质标出,如 ADP—形成、COA—酰化等。

2. 不管酶催化正反应还是逆反应,一般都用同一名称。

3. 如果所催化的反应包含两种变化,则尽可能用一种变化来表示(另一种功能附后)。如 D-天冬氨酸:氧化还原酶(脱氨)。

习惯命名法命名原则与系统命名法基本相同，但前者更为简短，它还包括一些简单名称，如脱氢酶、氧化酶、脱氨酶、激酶等。

除了以上共同的命名原则外，各大类酶有时有其特殊的命名规律和原则。如氧化还原酶往往为：供体：受体氧化还原酶。转移酶为：供体：受体被转移基团转移酶等。

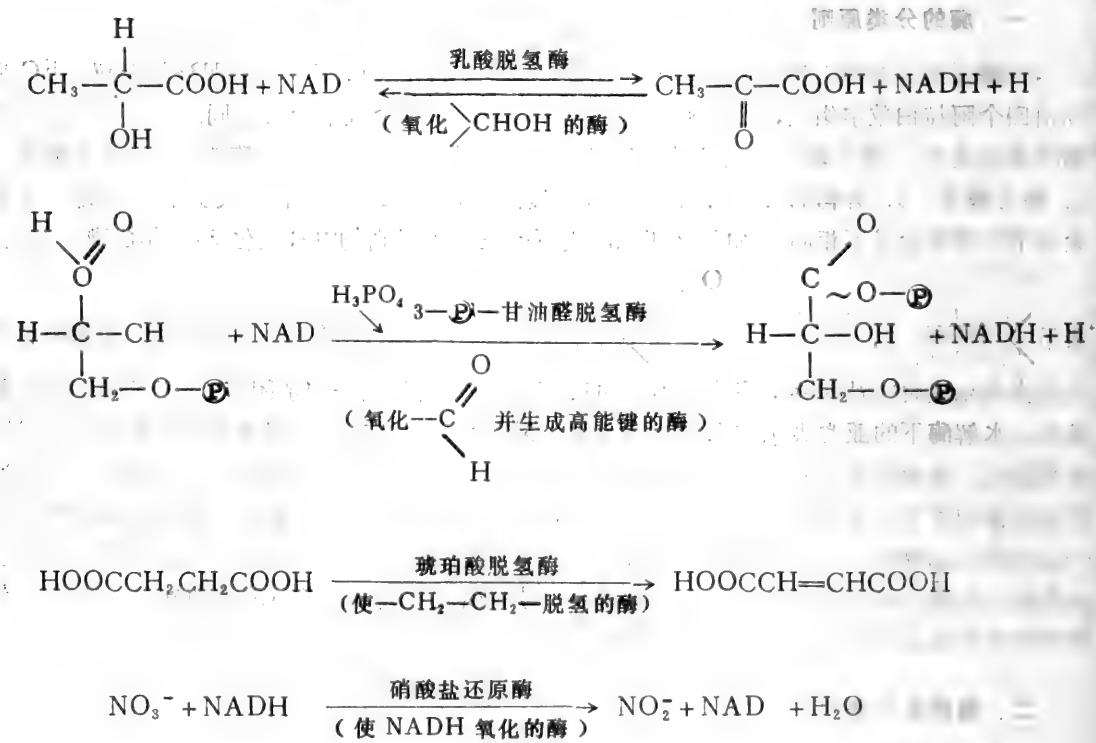
三、各类酶所催化的化学反应

(一) 氧化还原酶(Oxidoreductases)

这类酶不仅包括脱氢酶、氧化酶(1.1—1.10, 1.12, 1.16—1.17)，而且也包括以 H_2O_2 为氧化剂的过氧化物酶(1.11)、加氧酶和氢化酶(1.13)和1.14)等。

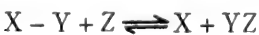
1. 脱氢酶(dehydrogenases)和氧化酶(oxidases)

这两种酶因底物种类不同，催化反应的性质和形式亦常有异，故难用一个通式来表示。现举数例如下，其它将在代谢各章介绍。

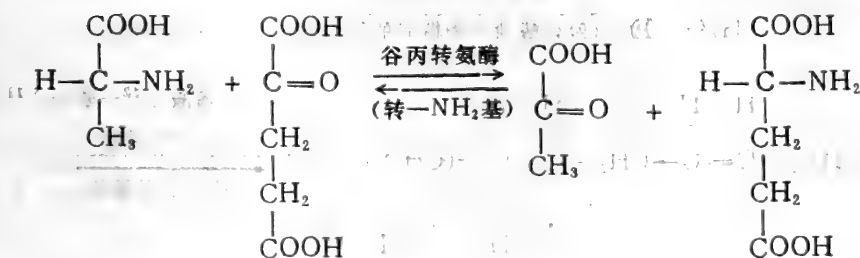
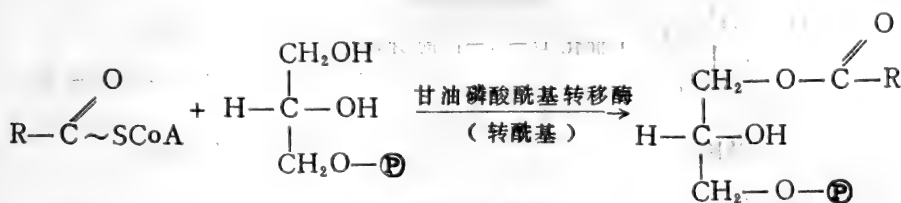
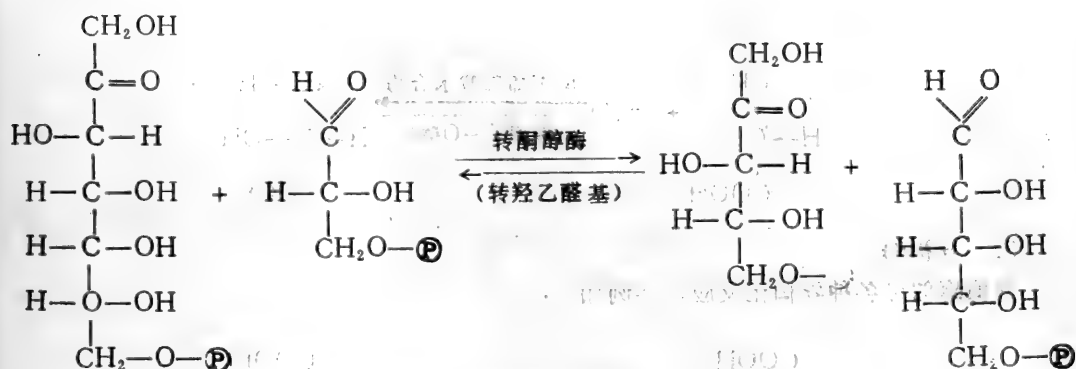


2. 转移酶

这种酶催化的反应通式为

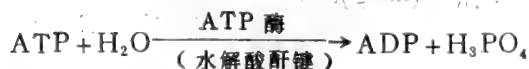
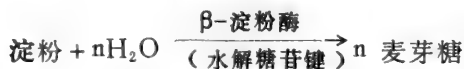
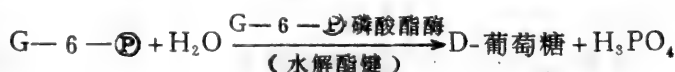


兹举数例如下：



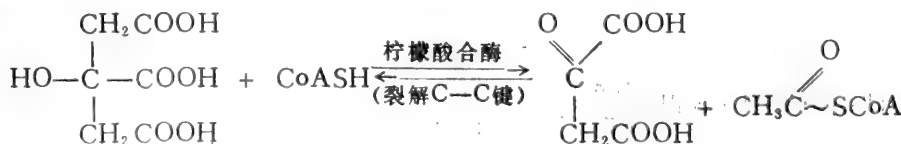
3. 水解酶

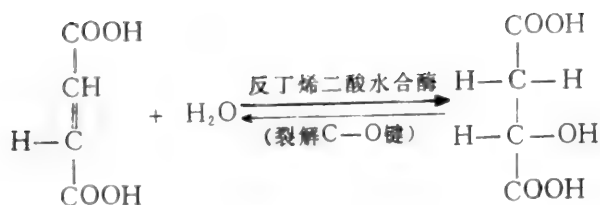
水解酶催化酯、硫酯、糖苷、肽、酸酐等键的水解反应，实例如下：



4. 裂合酶

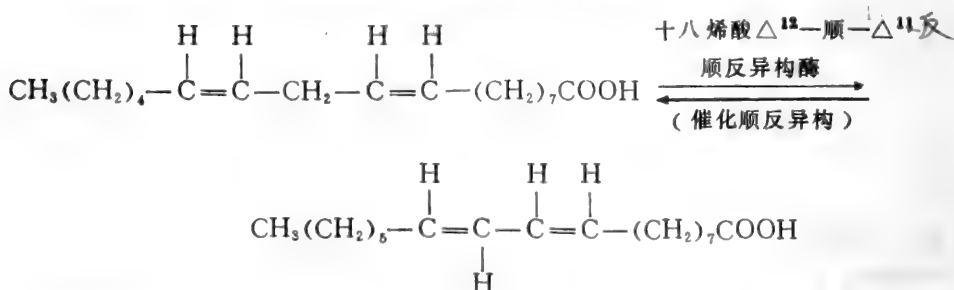
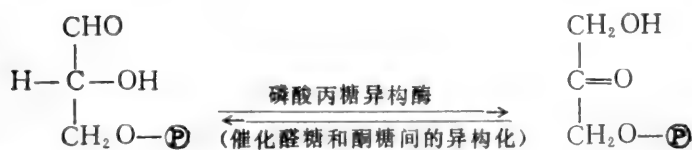
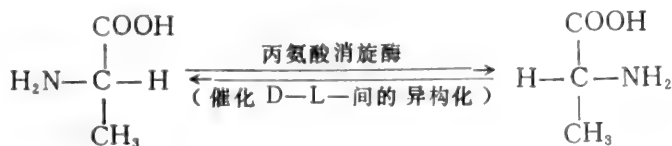
裂合酶催化通过消去反应裂解 C—C、C—O、C—N 等键而产生双键的反应及其逆反应。实例如下：





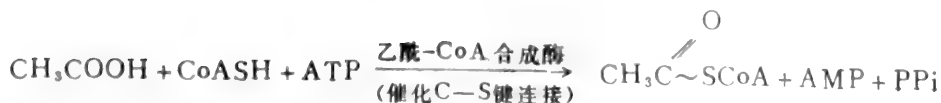
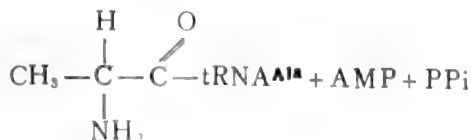
5. 异构酶

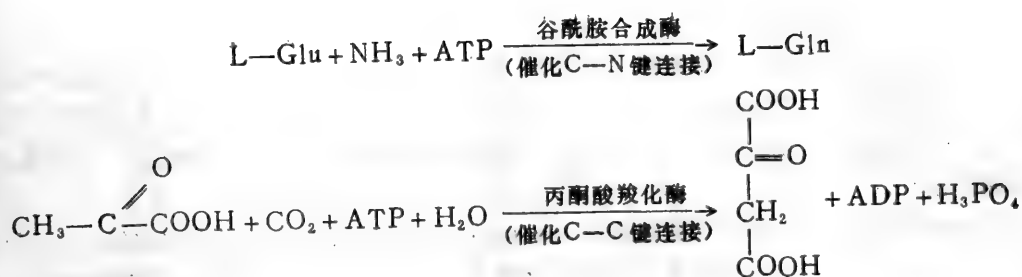
异构酶催化各种异构化反应。实例如下：



6. 连接酶

连接酶催化利用 ATP 或其它 NTP 供能而使两个分子连接的反应，实例如下：





第三节 酶的化学本质

一、酶是有催化活性的蛋白质

迄今所研究过的纯酶都是蛋白质，而且酶的催化活性，决定于其蛋白质结构的完整性，任何破坏酶蛋白一级结构骨架的因素如酸、碱、蛋白酶等都会破坏或降低酶的催化活性。任何蛋白质的变性因素，破坏蛋白质的二、三或四级结构的因素，如高温、极端PH、变性剂等，也都会破坏或降低酶的催化活性。所以酶是具有催化活性的蛋白质。

酶象其它蛋白质一样，分子量约在 12,000—1,000,000道尔顿范围。因此酶与它所催化反应的底物分子相比，分子量往往要大得多。图 6—1 是酶和底物分子尺寸示意图。

有些酶只含多肽链，是单纯蛋白质，如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶等。另一些酶除含蛋白质成分外，还含非蛋白成分，属复合蛋白质。那些非蛋白质成分，称为酶的辅助因子。辅助因子可以是无机离子，其中大部分是金属离子。如 Fe^{+++} 或 Fe^{++} 、 Cu^{+} 、 Zn^{+} 、 Mg^{++} 、 Mn^{++} 、 Mo^{+6} 、 Co^{++} 、 Ni^{++} 、 Se 、 K^{+} 等，也可以是一些有机物分子，称为酶的辅基。能与酶蛋白分开而存在的辅基称为辅酶，有些酶需要辅酶，还需要一个或多个金属离子才有活性。酶的蛋白质部分称为脱辅基酶，它和辅酶结合后，则称为全酶(holoenzyme)。

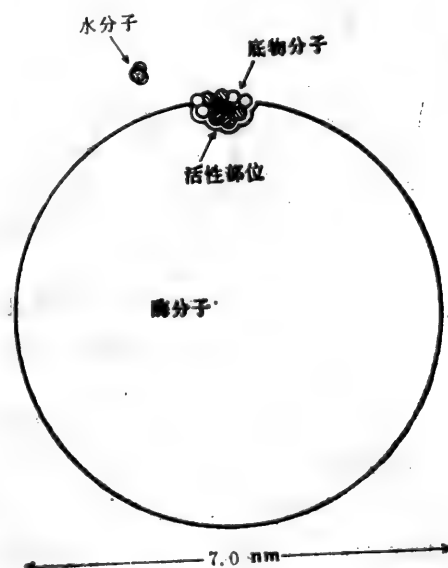


图 6—1 酶和底物分子的尺寸示意图

二、一些辅酶或辅基的结构、性质和功能

辅酶或辅基在酶促反应中大多是充当一些原子或基团的载体，把它们从一个化合物转移到另一个化合物上。兹择其重要者介绍如下。

(一)氧化还原载体

这种载体种类很多，有些已在第五章中介绍过了。

1. NAD⁺ 和 NADP⁺

NAD⁺ 和 NADP⁺ 是许多脱氢酶的辅酶，其结构及作用机制等在第五章已作过介绍。由于它们都有嘌呤环，在260nm有最大光吸收。其还原型的烟酰胺环形成醌型结构，在340nm有一光吸收峰（见图6—2）。因而可通过测定340nm处光吸收的增加，来测定这类脱氢酶的活性。

乳酸脱氢酶脱氢时 NAD⁺ 的载氢情况如图6—3。所有脱氢酶似乎都有相似的 NAD⁺-结合部位的结构，该部位有平行排列的肽链折叠层，每条肽链间以 α -螺旋或环相连结。

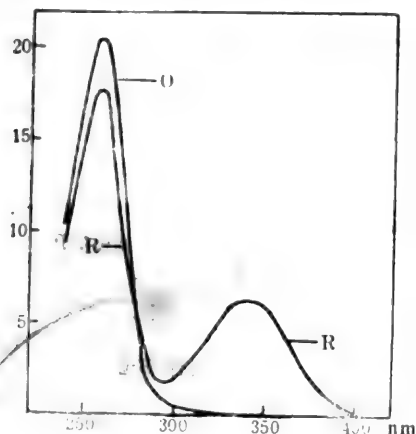


图6—2 NAD⁺和NADP⁺的氧化型(O)和还原型(R)的吸收光谱

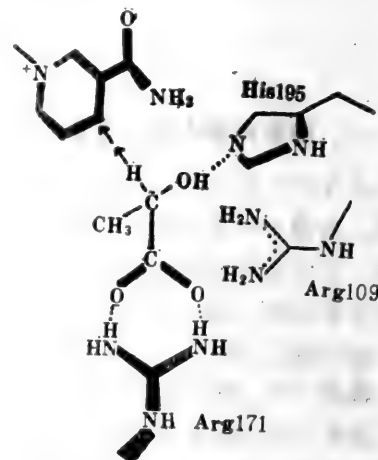


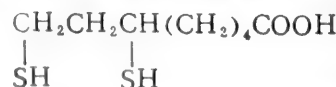
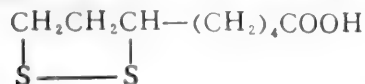
图6—3 乳酸脱氢酶NAD⁺的载氢图

2. 黄素酶辅基

黄素蛋白酶（即黄素酶）的辅基有 FMN 和 FAD 两种，结构见第五章。由于异咯嗪环的共轭体系，其在450nm处有一光吸收峰，并且具有黄色荧光。还原后共轭体系破坏，黄色荧光褪去。所以通过450nm荧光比色，可测定酶的活性。FMN 和 FAD 的吸收光谱如图6—4。它们与专一性不同的脱辅基蛋白相结合，形成黄酶（亦即黄素酶）。一般每个酶亚基结合一个辅基，除少数辅基可从酶蛋白上解离外，大部分都紧密地而且专一地结合于酶蛋白分子上，有些黄素辅基还载荷金属离子，共同作为酶辅基。

3. 二硫辛酸

二硫辛酸结构如下式。这个辅基以其羧基与酶蛋白某一赖氨酸侧链的 ϵ -NH₂ 形成酰胺，



其氧化型的二硫环在335nm处有吸收峰（如图6—5）。在生物体内的氧化型硫辛酸的还原往往伴随着一个酰基由 TPP 转移到硫原子上，使二硫键打开。反应见第九章酮酸的氧化脱羧。

4. 细胞色素辅基

细胞色素辅基都属血红素辅基。由于卟啉环上侧链不同，或与酶蛋白结合形式不同，可分为a、b、c、d四类。细胞色素c的血红素辅基及其与酶蛋白的结合如图6—6(a)所示。b的结构与c

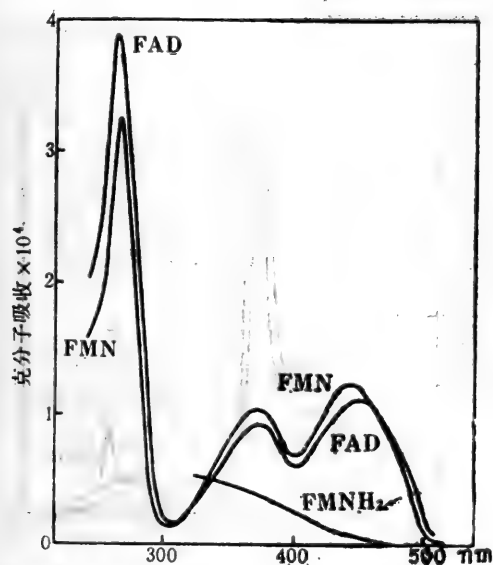


图 6—4 FMN和FAD的吸收光谱

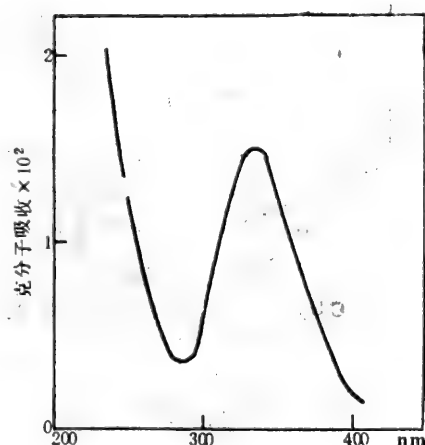


图 6—5 氧化型二辛酸的吸收光谱

相似,但不与酶蛋白共价结合,而且一般以正铁血红素辅基存在。a 的 8—位为 $-\overset{\text{O}}{\underset{\text{||}}{\text{C}}}-\text{H}$, d 的 7,8—位为 H 原子, a、d 的 2—位为 $-\underset{\text{OH}}{\underset{|}{\text{CH}}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)-$

$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$ 。细胞色素 c 中的 Fe 有六个配位键,如图 6—6(a)所示。其第五

个配位基是酶蛋白上的一个组氨酸的咪唑基,而第六个配位则是酶蛋白上一个甲硫氨酸的硫原子。有些细胞色素辅基,只有与吡咯氮形成四个配位键。细胞色素的吸收光谱如图 6—6(b)。

除上述实例外,还有醌类辅基,如泛醌,也是重要的氧化还原载体。

(二) 磷酸基载体

这类载体大部分是多磷酸核苷酸,含有这类辅基的酶称为激酶。例如通过两个激酶作用,ADP 可作为辅酶起磷酸载体的作用,把磷酸基从一个供体转移给受体,如下式:



磷酸供体



由于 ATP 磷酸酐键是高能键,所以 ADP 不仅是磷酸载体,也是能量载体(上式 ~ 代表高能键)。

(三) 羧基或 $-\text{COO}^-$ 载体

生物素是这种载体的辅基,其结构及作用机制见第五章。

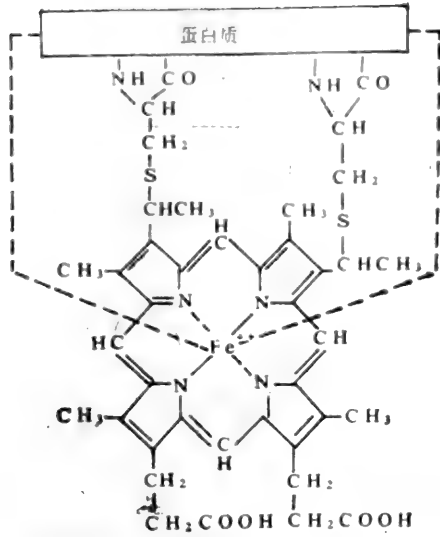


图6-6(a) 血红素辅基与酶蛋白的结合

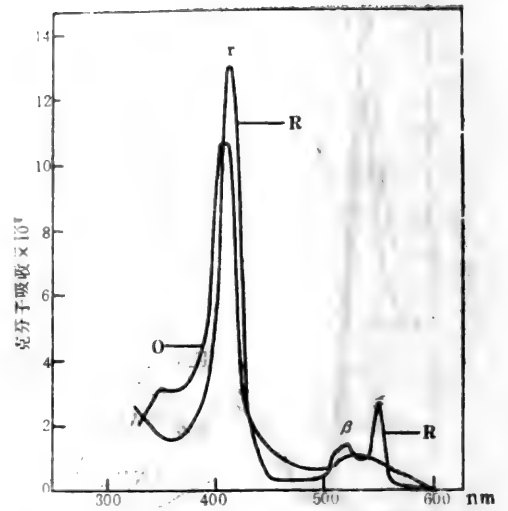


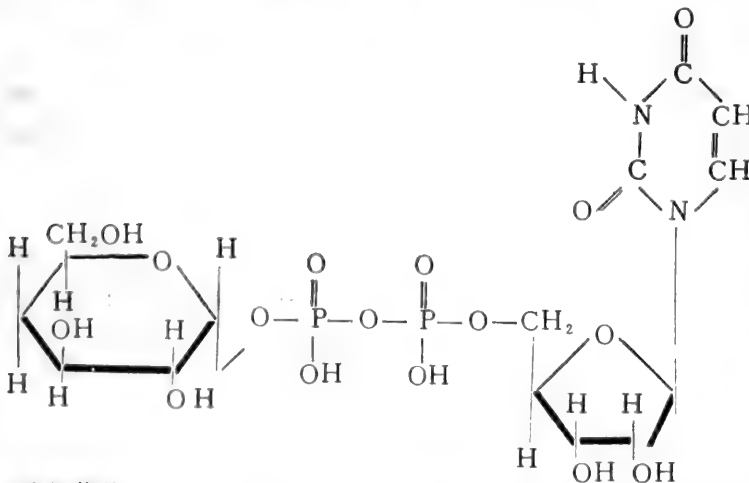
图6-6(b) 细胞色素辅基的吸收光谱

(四) 氨基载体

磷酸吡哆醛辅基属这一类。转氨酶、氨基酸脱羧酶、氨基酸消旋酶等的磷酸吡哆醛的载氨基作用都是通过其醛基与 -NH_2 形成 Schiff's 碱而实现的。机制见第五章。

(五) 糖苷基载体

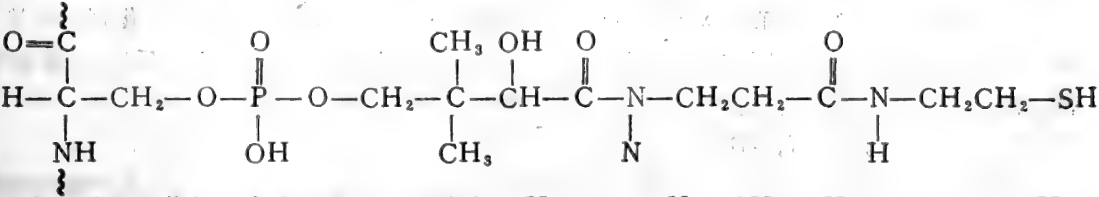
UDP 是糖苷转移酶辅基, 它能载荷一个己糖分子于其末端磷酸基团上。其中最重要的是载荷一个葡萄糖(形成UDP-葡萄糖, 简作UDPG), 然后把G转给一定受体以合成二糖、多糖等。UDPG结构如下式:



(六) 酰基载体

大部分这类辅酶含 -SH 。与酸作用, 即可载荷酰基形成高能硫酯键。所以它们亦常是能量载体, 类似磷酸基载体, 并能与之相互转移能量。CoASH 是生物体最常见的酰基载体, 其转酰机制将在糖代谢、脂代谢各章介绍。其结构、生物合成见第五章。此外还有一种酰基载

体是4-磷酸泛酰巯基乙胺辅基和一蛋白质构成的酰基载体蛋白(ACP-SH)，它在脂肪酸合成中转移各种酰基(见第十章)，作用类似 CoASH，结构为：



还有一种酰基载体，名为肉毒碱，结构为 $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2\text{COO}^-$ ，其 -OH 类

似于 CoASH 的 -SH，可载荷酰基。由于它是一个亲水性辅基，分子又很小，故可以载荷大的酰基通过线粒体膜，使大的脂肪酸分子在那里进行氧化。

(七) 一碳基团载体

生物体很多重要反应需要有 CH_3- 、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{C}\begin{smallmatrix} \text{O} \\ \text{H} \end{smallmatrix}$ 、 $-\text{CH}=\text{NH}$ 等一碳基团的转移。FH₄、维生素 B₁₂ 辅酶等的转移一碳基团机制见第五章。

(八) 活性醛基载体

焦磷酸硫胺素是典型的活性醛基载体，其实例已在第五章介绍。这是一个很重要的辅酶，它参与的代谢反应见第九章。

第四节 酶催化的特点

酶和一般无机或小分子有机催化剂一样，只要有少量存在即可大大加速一个化学反应。它们都促使反应迅速达到平衡，而不改变反应的平衡点，它们在反应过程中不会消失。有时它们也参与化学反应，但在继续反应中又会复原。它们加速化学反应的机制，都是降低反应所需要的活化能。那末酶催化究竟有什么特点呢？它和其它催化剂到底有什么不同呢？

一、酶是高效催化剂

酶的催化效率远比非酶催化剂要高，就分子比而言，酶催化反应的反应速度比非催化反应高 10^8-10^{20} 倍，而比其它非酶催化反应高 10^7-10^{13} 倍。以每克分子酶每分钟所能催化底物转变的克分子数来说，大部分酶为1,000，即一克分子酶每分钟可催化1,000克分子底物发生反应。最高的可达 10^7 ，例如碳酸酐酶为 3.6×10^7 。即每克分子碳酸酐酶每分钟可催化 3.6×10^7 克分子碳酸分解成 CO_2 和 H_2O 。酶催化效率之高也可从脲酶催化尿素水解的速度看出，在 pH8.0，20℃，脲酶催化尿素的水解速度加快 10^{14} 倍。酶在这

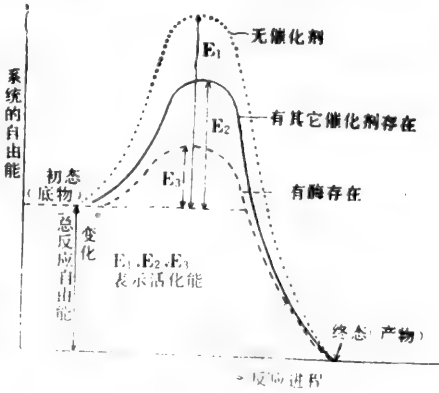


图6-7 酶和其他催化剂降低催化反应活化能示意图
图中 E₁、E₂、E₃ 表示活化能。

样温和的温度和 pH 条件下，能有这样惊人的催化能力，主要是由两方面的原因造成的。

(一) 酶可降低反应所需的活化能

比起其它催化剂来，酶能大大减少反应所需的活化能。图 6—7 表示无催化剂、有其它催化剂和有酶存在下反应所需活化能的比较。从图 6—7 可知酶可大大降低反应所需活化能。酶能大大减少反应所需活化能，这主要是由两方面的原因引起的。

1. 酶的邻近和定向效应

酶以一定的方式结合底物，使底物的敏感键紧紧邻近酶的催化基团，而且也明显地使底物定位，这样就大大地增加酶-底物 (ES) 复合物达到过渡态的可能性，也就减少了反应所需的活化能。这是利用酶和底物结合成 ES 复合物时所释放的能量，支付底物和酶“邻近和定向”时的熵损失。这样当 ES 形成过渡态时就不再需要用那么多的活化能来支付把底物聚集在一起的熵损失，因而使反应活化能降低。所以酶催化的这一因素是熵因素的催化作用。酶对底物的邻近和定向效应可用图 6—8 表示。



酶和底物既不邻近
方向也不合适

酶和底物两个作用基团处于邻近，但方向不适应。

酶和底物两个作用基团十分邻近，且方向刚好匹配。

图6—8 酶对底物的邻近和定向效应

2. 酶对底物的扭曲和变形 (Strain and distortion)

当底物不存在时，许多酶都以非活性形式存在，这时并非所有活性部位的基团都在空间上正确定位而能与底物上的互补基团相互作用。但当结合一个专一性底物后，导致酶分子产生一构象变化，从而使活性部位的构象产生相应变化，使该部位的一些 R-基团移动到正确位置，以适于与底物结合，这种因底物诱导而产生的酶构象变化称为酶作用的诱导契合 (见图 6—9)。

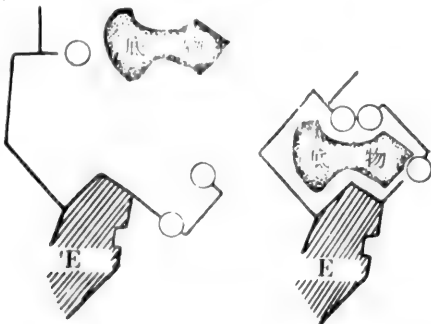


图6—9 酶与底物的诱导楔合作用

这种诱导楔合的结合必然使酶的结构产生一定的扭曲和变形，这种扭曲和变形所需的能量正好可由酶-底物形成复合物时所释放的能量来支付。这种扭曲状态进入过渡态时当然就不再需要那么多活化能了。从这一点也说明，酶-底物部位虽只占其整个分子的一小部分，但为了诱导楔合

活化能了。从这一点也说明，酶-底物部位虽只占其整个分子的一小部分，但为了诱导楔合

的需要，整个酶分子应是比底物大得多的一个蛋白质分子。

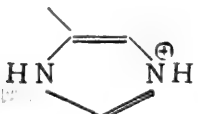
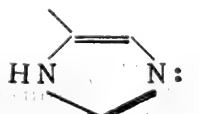
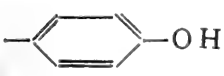
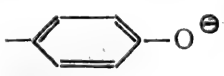
(二)酶催化是多因素协同作用的催化

除了上面两个催化因素使酶能降低其催化反应的活化能外，酶促反应中往往还有一些重要的催化因素同时起作用。

1. 酶对底物起共轭酸碱催化作用。

这种催化作用类似于无机的酸碱催化作用，它是由于酶活性部位存在一些特殊的氨基酸侧链基团（见表6—1）。它们是优良的质子供体或质子受体，可对一定反应底物行使催化功能。其中特别是组氨酸侧链的咪唑基，既是良好的质子供体又是良好的质子受体。例如核

表6—1 酶分子中的共轭酸碱催化基团

质 子 供 体	质 子 受 体
$-\text{COOH}$	$-\text{COO}^{\ominus}$
$-\text{NH}_3^{\oplus}$	$-\ddot{\text{N}}\text{H}_2$
$-\text{SH}$	$-\text{S}^{\ominus}$
	
	

糖核酸酶催化核糖核酸的水解过程中，就包括两个组氨酸协同起酸碱催化作用（His₁₂和His₁₉），一个起碱催化作用，吸引一个核苷酸单位上2—OH的一个质子，促进不稳定中间物——2,3环磷酸化合物的形成；另一个则起酸催化作用，把质子给予断裂而离去的核苷酸单位。而当环磷酸中间物水解时，它们又各起相反的作用，酶分子复原（反应见酶促反应机制一节）。

2. 酶对底物的共价催化作用

酶活性部位有一些亲核或亲电基团，可进攻底物分子的富电子或缺电子基团，形成不稳定的共价中间物，它分解成产物时要比非催化反应容易得多。在酶催化中，特别是亲核催化尤为重要且常见。如丝氨酸蛋白酶催化蛋白质肽键水解过程中，就有一丝氨酸侧链，由于处在酶分子中的特殊部位，形成了亲核性极强的烷氧基（ $-\text{CH}_2\ddot{\text{O}}:$ ），易亲核攻击肽键羰基碳而形成共价酯键—酶-底物中间物，促进进一步反应（见酶促机制一节）。

二、酶催化作用具有高度专一性

有些酶催化一种反应，只作用于一套底物。如反丁烯二酸酶只催化L-苹果酸和反丁烯二酸相互转变的反应，但不能催化顺丁烯二酸和D-苹果酸为底物的反应。另一些酶具有较广的底物专一性，例如一些蛋白酶都能催化蛋白质或多肽的水解，但对不同氨基酸形成的

肽键具有专一性，而且对氨基酸的构型有严格的立体专一性。如胰蛋白酶只催化碱性 L-氨基酸羧基和其它氨基酸所形成的肽键，而胰凝乳蛋白酶只催化芳香 L-氨基酸羧基所形成的肽键的水解。还有一些酶专一性更广，如许多蛋白酶也能催化酯及硫酯的水解。许多酯酶可催化各种酯类水解。

酶对其所催化反应的底物为什么会显示专一性呢？上面介绍的酶对底物的邻近和定向效应，以及底物对酶的诱导楔合作用都要求酶活性部位和底物之间必需存在许多互补基团，才会产生多重专一性相互作用。而这种专一性的结合正是酶催化作用的驱动力，也是所有酶能降低反应活化能以加速酶促反应的原因。兹以磷酸葡萄糖变位酶为例来说明酶对底物的专一性以及酶-底物专一性结合与酶催化效率的关系。

在 Mg^{2+} 和葡萄糖-1, 6-二磷酸(G-1, 6-二②)存在下，磷酸葡萄糖变位酶催化 G-1-②和 G-6-②之间的相互转变，在反应过程中有酶-磷酸中间物生成。那是酶的一个丝氨酸残基遭受磷酸化而生成的。它与底物和 G-1, 6-二②经不断交换磷酸基，反复作用而使两种葡萄糖磷酸得以互变。



$E-CH_2-O-P \begin{matrix} O \\ \parallel \\ O^- \end{matrix}$ 在水溶液中稳定，但遇到各种 ROH 化合物则会以不同反应速度按下面方式反应。

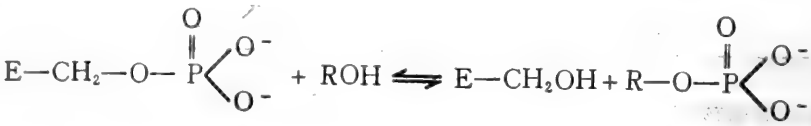
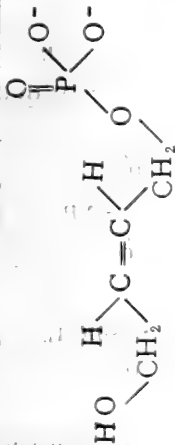

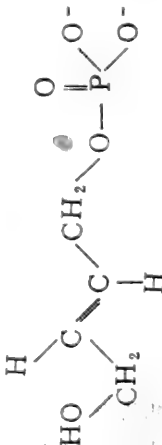
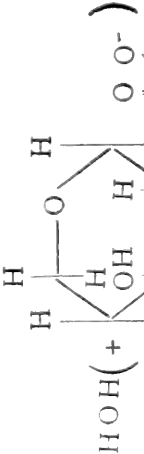

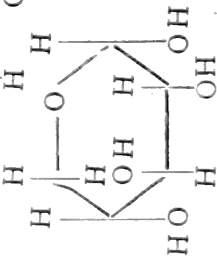
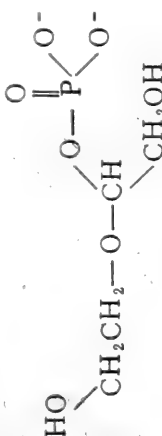
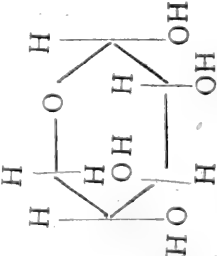
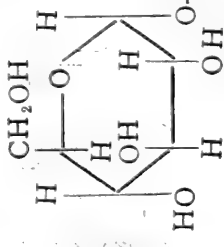
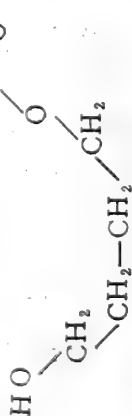


表 6—2 是该酶使各种 ROH 磷酸化的相对速度。

比较表 6—2 中各种磷酸化速率，不难看出酶-底物结合的专一性以及这种专一性结合与催化效率之间的有趣关系。酶向水分子转移磷酸基速度极慢，只比非酶促水解磷酸丝氨酸快 60 倍。但有亚磷酸或 D-木糖-1-②等非酶底物存在时，酶向水分子转移磷酸基的速度增加到 580 至 1.7×10^6 倍。这充分说明底物类似物亚磷酸一定结合在酶的磷酸结合部位，而 D-木糖-1-②则结合于其糖结合部位，这些基团间的结合是专一的，而且这种专一性结合一旦形成，将会使酶上磷酸基的反应性能大大加强。表中酶向 D-木糖转移磷酸远比向 H_2O 转移快，说明木糖这个底物类似物，与酶上的糖结合部位一定专一性互补而形成结合。如果同时有亚磷酸存在，则酶向木糖转移磷酸的速率很接近天然底物葡萄糖-1-②。前者为 2×10^9 ，后者为 3×10^{10} 。这也说明酶上有一个与底物磷酸互补的基团造成这种专一性结合。其它一磷酸二酯，它们的一OH 和磷酸基相距四个碳原子，结构也类似于天然底物 G-1-②，也可与酶上相应基团互补而专一性结合，因而酶向它们的一OH 上转移磷酸基的速度比向水快 10^5-10^7 倍。从表 6—2 中各种实例充分说明：只有合适结构的底物，才能与酶上相应基团匹配而结合于酶的活性部位，酶才能对它发挥催化功能。这就是酶对底物具有高度专一性的原因。一般说来，任何酶的底物必须有两个明显特点：①有被酶作用的化

表6-2 磷酸葡萄糖变位酶磷酸化各种ROH化合物的相对速度
(以水的磷酸化为1, 其它都相对水而言。水的实际速率在37°C, pH7.5时为 3.2×10^{-8} /Sec)

底物(ROH)	相对速率	底物(ROH)	相对速率
HOH	1		4.4×10^6
HOH (+ )	580		1.4×10^9
HOH (+ )	1.7×10^6		4.4×10^7
	7×10^4		9×10^5
	2×10^9		3×10^{10}
	2×10^5	(天然底物)	

学键：②底物分子上必需有一个或多个结合基团，使它能结合于酶分子上，并能恰当地定位于酶的活性部位，并使其敏感键明显地靠近酶催化基团。图6—10是胰凝乳蛋白酶底物专一性示意图和作用底物的结构，从图中可以看出：该酶需要底物有一个疏水基团结合于酶上的

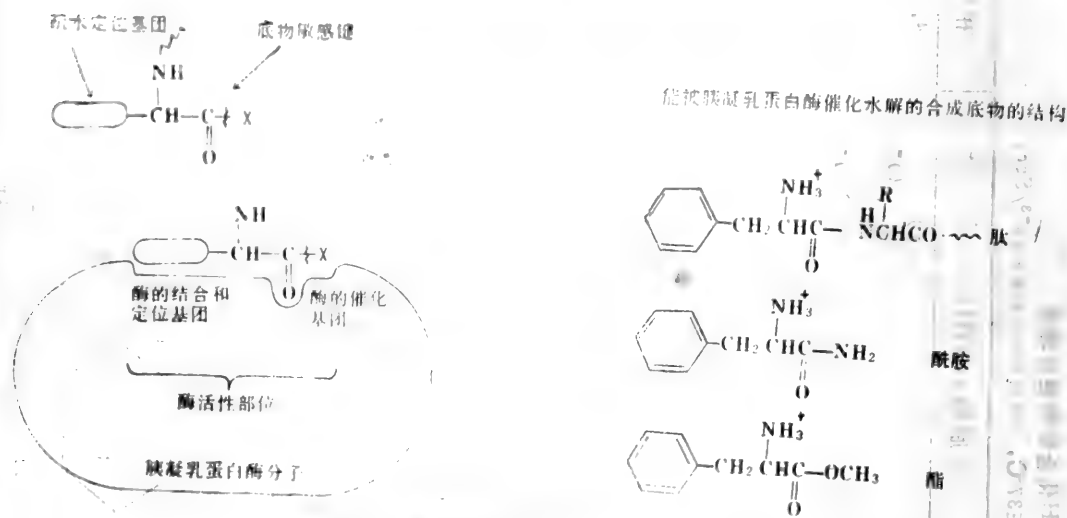


图6—10 胰凝乳蛋白酶底物的专一性

(a) 底物在酶分子上的结合和定位。

(b) 胰凝乳蛋白酶的专一性底物的结构。

一个疏水部位。这个结合对底物在酶上起定位作用，使底物的敏感键处于酶的催化部位。同时这种结合和定位所释放的能量，又可作为催化的驱动力。关于该酶的详细催化机制将在酶催化机制一节再作介绍。

第五节 酶的活力测定

一个酶是否存在，其催化活性大小如何，一般都是根据它所催化的化学反应是否发生，以及反应速度如何而定的。所谓酶的活力就是指酶催化某专一化学反应的能力。活力的大小是用一定条件下所催化某专一性反应的反应速度来表示。酶促反应速度愈大，酶的活力就愈高，反之则低。酶活力的测定，不是仅研究酶的性质、动力学特征所必需，在酶制剂的生产、酶的纯化和应用等方面，也是不可缺少的步骤。

一、酶反应速度的测定

酶促反应速度常用单位时间内单位体积中底物的减少量或产物的增加量来表示，即用 $-\frac{d[s]}{dt}$ 或 $\frac{d[p]}{dt}$ 来表示。一般以后者为佳。我们将产物生成量对反应时间作图，所得曲线称为进程曲线，如图6—11所示。从图中可以看出，反应速度只在最初一段时间内保持恒定，随反应时间的延长，酶促反应速度即下降。引起下降的原因可能有以下几方面：①产物

①对酶的抑制；②产物增加，逆反应也增加；③随着底物浓度减少，酶被底物饱和的程度降低；④酶或辅酶在某反应温度或某 pH 条件下不稳定而部分失活。以上几个因素可单独起作用，亦可同时起作用，因此酶促反应的进程曲线，不符合均一化学反应的标准方程，不是线性的。只有在初始阶段，上述各种因素的干扰尚未起作用时，才能准确测得反应速度，这时的速度称为初速度。初速度的求法是测出初始阶段的进程曲线，从零点画一切线，从该线斜率求得。一般底物消耗量不超过20%时，所得曲线都是线性的，超过此限度，结果将不准确。下面用一个实例来说明这个问题。

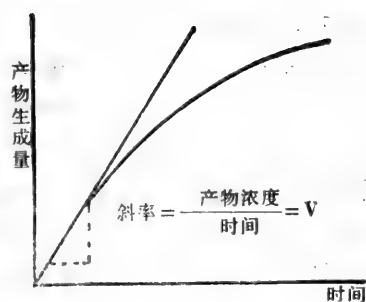


图 6—11 酶促反应进程曲线

图 6—12(a)是三个不同酶量所得的进程曲线，曲线中的 A、B、C 代表1、2、4、三个

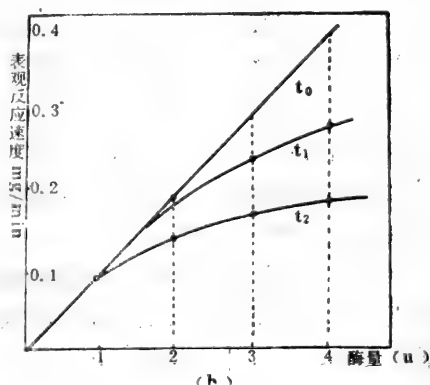
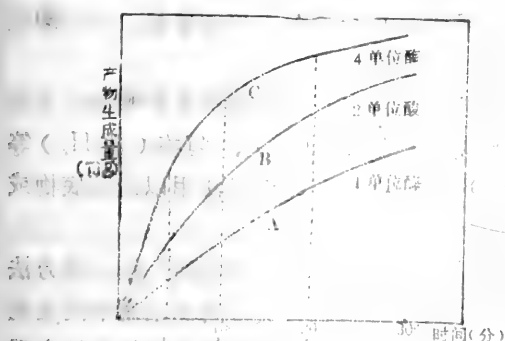


图6—12 (a)为三个不同酶量的进程曲线

(b)不同酶所测得的表观速度对酶量作图

不同酶单位数所作的进程曲线。在 t_0 时测得的初速度对酶量作图得一直线，说明在该时间范围内，酶促反应速度与酶量成正比；而在 t_2 时间则所测得的酶促反应速度与酶量不成正比关系，说明把 t_2 所测得的结果来计算反应速度是错误的（见图 6—12(b)）。

观察酶促反应，有隔时抽样检测法和连续观测法两种。通过前者可获得许多不连续点，从而连成一进程曲线。一般至少取三点，最好所隔时间成倍数关系，这样可以检验所选时间间距曲线是否呈线性。应用此法必需严格控制取样时间，取样后立即加入试剂以终止反应，后者是连续取同一混合物时所产生的变化，取其线性部分，或用连续记录器记录。此法是优先应用以追踪酶反应的方法。

二、定量追踪酶促反应的方法

用以追踪酶促反应的方法很多，兹介绍几种常用方法作为例子。

(一)分光光度法

许多酶促反应的底物或产物能吸收不同波长的光。在测量酶促反应过程中，某波长光吸收的变化，往往能追踪酶促反应的进程。例如反丁烯二酶水合酶催化反丁烯二酸和 L-苹果

酸之间的互变。底物反丁烯二酸的双键系统在 300nm 处有很强的光吸收, L-苹果酸则无此光吸收。因此测 300nm 处的光吸收变化,即可定量测得一定条件下该酶的酶促反应速度。又如以 NAD^+ 或 NADP^+ 为辅酶的脱氢酶,在酶促反应过程中辅酶还原成 NADH 或 NADPH ,它们在紫外区 340nm 处有一强的光吸收带,因此通过测量 340nm 处的光吸收变化,可以定量追踪脱氢酶的活性。此外如黄酶的氧化态辅基在 450nm 处有大的光吸收,而还原态则无。细胞色素类辅基的还原态在可见光区有很明显的吸收峰,而氧化态在该处无光吸收。这些性质使分光光度法成为测定这类酶促氧化还原反应的理想方法。总之分光光度法简单灵敏,只需少量样品即可获得整个进程,是最方便而又广泛使用来定量追踪酶促反应的好方法。

(二) 荧光法

在有些情况下测荧光变化甚至比测一般光吸收变化更灵敏。如黄素辅基在氧化态发强荧光,还原态则荧光消失。 NAD 和 NADP^+ 不发荧光,而其还原态 NADH 或 NADPH 则有蓝色荧光。所以对这类酶可通过灵敏的荧光强度测定,以追踪酶促反应活性。不仅如此,有时还可以从酶蛋白中荧光基团的性质,推知它们在酶分子内部所处环境的信息。对于酶促反应中有荧光变化的,用此法追踪该酶促反应活性最为优越。

除了上面介绍的两种常用方法外,在酶促反应中有气体参与或有气体产生,则测压法是一个方便而准确的方法。如氧化酶(吸收 O_2)、脱羧酶(释放 CO_2)、氢酶(放 H_2)等常用此法测定酶活性。此外还有极谱法用以追踪含 O_2 的酶促反应;旋光法用以追踪底物或产物具有旋光性的酶促反应。

以上方法都适用于连续法观测酶活性。如果用抽样法测定酶活性,则除了用上述方法外,还可用各种化学方法来测定底物或产物的浓度。这时要因酶的种类不同而采用不同的测酶活性方法,没有什么共同规律可循。如许多与磷酸化合物有关的酶促反应常用钼酸铵定磷法来追踪酶活性。Fehling's 铜还原法常用以追踪与糖类有关的酶促反应等。如果以上各种方法都不能应用,则可用层析或电泳方法把产物分开,以产物的层析或电泳图谱来定性产物。如需定量,可在一定波长光下直接扫描测定。例如限制性核酸内切酶的测定,就是通过一定条件下酶切某 DNA,然后观测切割后的电泳图谱而确定酶的性质,再用荧光扫描法测酶切图谱中的产物量或剩余底物量,从而定量地追踪酶活性。

三、酶活力的表示方法

国际生物化学联合会酶学委员会规定了三种量来表示酶的活力。

(一) 酶单位

酶活力常以酶单位表示。国际上所规定的酶单位是:在一定条件下一分钟内能催化一微克分子底物发生转变的酶量称为一个酶单位,以 $\text{U}(\text{unit})$ 表示。所谓条件是指温度、 pH 、底物浓度等。常用温度为 25°C ,常用 pH 为酶的最适 pH ,底物浓度远大于酶浓度。如果用 U 不方便,也可用毫单位 (mU) 千单位 (kU) 表示。上面定义的酶单位有时并不能方便地用于各种酶,酶学工作者也常根据需要各定出合适的单位。如限制性内切酶就常用在一定条件下彻底水解 $1\mu\text{g}$ 某 DNA 所需酶量称为一个酶单位。

(二) 比活 (Specific activity)

比活是指每毫克酶蛋白所含有的酶单位数，以 U/mg 蛋白表示。在酶纯化过程中，每步纯化后都需要测酶的比活，比活愈高，说明酶的纯化程度愈高。当比活达到恒定时，说明酶几乎达到了均一程度。

(三) 克分子活性

这是指在最适底物浓度下，每微克分子酶所含的酶单位数。当酶具有辅酶或催化中心，而它们的浓度又可测定时，则酶的催化力 (Catalytic power) 可以用酶的催化中心活性表示，即每一催化中心每分钟所转变的底物分子数。又称它为转换数 (Turnover number)，常以 $T.N.$ 表示。

第六节 酶促反应的动力学

酶促反应的动力学就是研究酶促反应的速度问题，研究各种条件对酶促反应速度的影响。对于酶的催化机制的揭露，动力学常是不可缺少的手段。动力学在研究酶的应用以及许多特有的生命现象中也是重要的手段之一。

一、底物浓度对酶促反应速度的影响

(一) 底物浓度与酶促反应初速度关系的实验结果

许多酶的实验结果都表明，当酶浓度恒定时，底物浓度对酶促反应速度的影响不成线性关系。在极低底物浓度下，酶促反应速度随底物浓度增加而线性地增加，反应属一级反应。当底物浓度超过一定限度后，继续增加底物浓度，反应速度即不再按线性增加。在极高底物浓度时，反应速度几乎不再随底物浓度的增加而增加。即达到了最大值 (V_{\max})。图 6—13 底物浓度对酶促反应速度实验所作的图，曲线是一条双曲线。

根据图 6—13，1903 年 Henri 提出假设，“酶与底物分子形成酶——底物复合物是酶促反应的必须步骤。当所有酶都被底物饱和时，再增加底物浓度，酶——底物复合物浓度就不再增加，所以反应速度也就不会再加快”。这一假设后来就成为酶促反应的一个普遍理论。而且酶——底物复合物的存在也反复得到实验证实。如已用电镜观察到核酸和其聚合酶的复合物；已用 x—射线晶体学方法观察到许多酶——底物或底物类似物与酶的复合物，如甘氨酸-L-酪氨酸—羧肽酶复合物；用 ^{32}P 示踪法从磷酸甘油激酶的酶促反应中分离出了 ^{32}P —酶。有些 ES 复合物虽未直接分离或观察到，但从酶与底物结合后的吸收光谱变化也间接地证实了 ES 复合物的存在。

(二) 酶促反应的速度方程

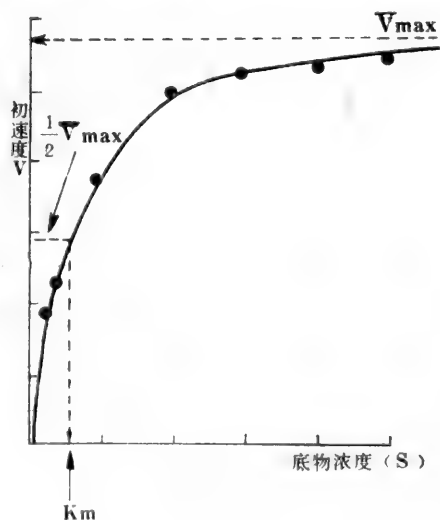


图 6—13 酶促反应速度与底物浓度关系图

Heni 以及后来 Michaelis 和 Menten 对酶促反应提出了一个简单模式:



即酶 E 与底物 S 可逆地结合成 ES 复合物, 然后 ES 复合物再分解成产物和原来的酶。由于反应初期 P 很少, E + P 的逆反应可忽略不计。他们根据以上假设, 再加上自己进一步提出一些假设都各自推导出了速度方程。兹介绍一种推导方法如下。

Brigg's 和 Haldane 首先假设 ES 在反应过程中很迅速地达到稳态平衡, 即 ES 的形成速度很快与其分解速度相等, 即 ES 不随时间而变。

ES 形成速度 = $k_1[E][S]$

ES 分解速度 = $k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad \therefore k_1[E][S] = (k_{-1} + k_2)[ES]$

根据 Michaelis 和 Menten 的假设

总酶浓度 $[Et] = [ES] + [E]$ (自由酶浓度)

$\therefore k_1(Et) - [ES][S] = (k_{-1} + k_2)[ES]$

$$\therefore [ES] = \frac{k_1[Et][S]}{k_1[S] + k_{-1} + k_2} = \frac{[Et][S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} \quad (6-2)$$

根据 Michaelis 假设 k_{-1} 远大于 k_2 , 以所 $ES \rightarrow E + P$ 的反应为总反应的限速反应。

$$\therefore v_0 = k_2[ES] \quad (6-3)$$

将 (6-2) 式的 $[ES]$ 代入 (6-3) 中得:

$$v_0 = \frac{k_2[Et][S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} \quad (6-4)$$

当所有酶都被底物饱和时, $[ES] = [Et]$

反应速度 = $V_{\max} = k_2[Et]$, 代入 (6-4) 式, 并将其中的复合速度常数用 K_m 来代替, 则

$$v_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (6-5)$$

这就是酶促反应的速度方程, 称为米氏方程。方程中的 K_m 称为米氏常数 (Michaelis 和 Menten 的第一个字母为 M, K_m 是为纪念他们而用的)。从 (6-5) 式可知, 当 $v_0 = \frac{1}{2}V_{\max}$ 时, $K_m = [S]$ 。这意味着当初速度刚好的为 $\frac{1}{2}V_{\max}$ 时, 这时的底物浓度恰好等于 K_m 。米氏方程是大部分酶促反应动力学的基本方程, K_m 是一个酶对一特殊底物的特征性常数。所以如果我们知道一酶促反应的 K_m 和 V_{\max} , 就可根据 (6-5) 式求得给定 $[S]$ 浓度下的反应速度。

根据米氏方程作 v_0 对 $[S]$ 的图, 其结果就与实验数据所作的图一样 (图6-13)。这充分说明米氏方程是真正能代表一个酶促反应的速度方程。

(三) K_m 和 V_{\max} 的准确求解

米氏方程的关键因素是 K_m 值，在一定 pH 和一定温度 条件下，对一专一性底物来说 K_m 是一给定酶的特征性常数。根据 K_m 的定义，它可以从图6-13近似求得。更准确的求法是将米氏方程化成一些线性方程而求得，其中较常用的是双倒数方程，即把米氏方程两边取倒数而构成。

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max}[S]} \text{ 或 } \frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

(6-6)

式(6-6)为一个线性方程；把 $\frac{1}{v_0}$ 对 $\frac{1}{[S]}$ 作图得一直线，其纵截距 = $\frac{1}{V_{\max}}$ ，斜率 = $\frac{K_m}{V_{\max}}$ ，故横截距 = $-\frac{1}{K_m}$ 。这样可直接从图测得 $\frac{1}{K_m}$ 和 $\frac{1}{V_{\max}}$ 。从而可求得 K_m 和 V_{\max} (图6-14)。

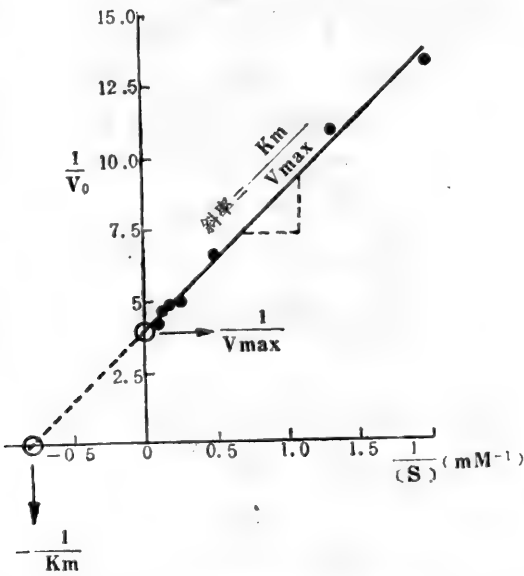


图6—14 酶促反应的底物浓度对反应速度的双倒数图

表6—3 一些酶的 K_m 值

酶	底 物	$K_m(mM)$
过氧化氢酶	H_2O_2	25
己糖激酶	ATP	0.4
	D—葡萄糖	0.05
	D—果糖	1.5
	HCO_3^-	9
碳酸酐酶	HCO_3^-	9
胰凝乳蛋白酶	Gly—Tyr—Gly	108
	N—苯甲酰—L—酪氨酰胺	2.5
β -半乳糖苷酶	D—乳糖	4.0
苏氨酸脱水酶	L—苏氨酸	5.0

表6—3是一些酶的 K_m 值。从表中可以看出，有些酶如过氧化氢酶、碳酸酐酶要达到 $\frac{1}{2}V_{max}$ ，需要相当高的底物浓度。而另一些酶如脑己糖激酶催化将 ATP 的磷酸基转移到 D—葡萄糖上，只要在极低底物浓度下即可达到 $\frac{1}{2}V_{max}$ 。具有双底物的酶，它们对两种底物有不同的 K_m 值，如己糖激酶对 ATP 和对 D—葡萄糖的 K_m 不同。同一个酶催化有共同结构的不同底物， K_m 也不同，如己糖激酶催化 D—葡萄糖和 D—果糖磷酸化其 K_m 不同，胰凝乳蛋白酶催化两种不同底物的水解，其 K_m 不同。在细胞内，各种酶往往没有被底物饱和，因此不会呈现其可能的最大反应速度。所以各种酶可根据其底物浓度的变化来调节细胞内各种酶促反应速度。

(四) V_{max} 和 K_m 的含义

V_{max} 是酶工作效率的表达，然而要比较不同酶的催化效率，首先必需用相同克分子量的酶来表示 V_{max} ，即单位时间（一分钟或一秒钟）内每克分子酶催化底物的克分子数， V_{max} 的这一表示方式也就是上面所介绍的克分子活性或转换数，即克分子活性 = V_{max} /酶的克分子数。现举一例说明之：有一动力学实验在 pH7、温度为35°—37℃等最适条件下进行。1μg 碳酸酐酶显示其 V_{max} 为 $1.2 \times 10^{-3} \text{mol CO}_2/\text{min}$ ，该酶的分子量为30,000g/mol，1μg 酶 = $0.000001/30,000 \text{mol}$ 的酶 = $3.33 \times 10^{-11} \text{mol}$ 酶。所以克分子活性 =

$$\frac{1.2 \times 10^{-3} \text{mol CO}_2/\text{min}}{3.3 \times 10^{-11} \text{mol 酶}} = 3.6 \times 10^7 \text{mol CO}_2/\text{min/mol 酶}。$$

即一克分子碳酸酐酶每分钟可催化 36×10^7 克分子 CO_2 起反应。这说明碳酸酐酶是一个催化效率很高的酶。从而可知 V_{max} 是一个酶工作效力的度量。

K_m 是 $v_0 = \frac{1}{2}V_{max}$ 时的底物浓度，已如上述。也就是说 K_m 表示结合一半有效酶产生一半 V_{max} 时所需底物的浓度。这个定义意味着 K_m 可用来估价一给定酶对各种相似底物的作用专一性程度。下面举己糖激酶催化各种糖的 K_m 为例。己糖激酶催化反应：

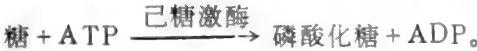


表6—5 各种糖的结构及己糖激酶所催化的反应 K_m 值

底物结构	$\begin{array}{c} \text{CHO} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CHO} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CHO} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$
底物名称	D—葡萄糖	D—阿洛糖	D—甘露糖
酶的 K_m 值	8×10^{-8}	8×10^{-8}	5×10^{-8}

比较表6—5中的各 K_m 值可以看出，要使50%的酶被底物饱和，所需的葡萄糖的量只

$1/K_m$ 就可作为酶和底物的亲和力的度量。因此,一般说来, K_m 值越低,说明酶和底物形成 ES 的亲合力越强。但必须注意,对不同的酶,特别是底物和反应类型都不同的酶,则不能作这样的对比。

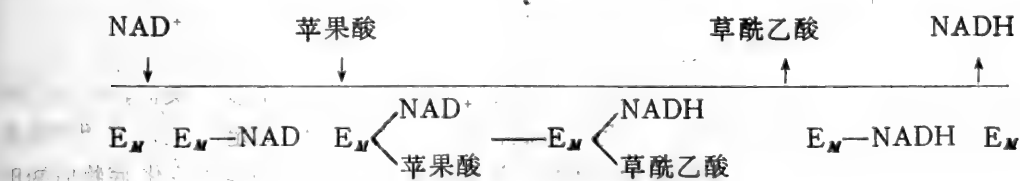
(五)多底物酶促反应

生物体内许多代谢过程的酶促反应，往往都有两个或两个以上不同的底物结合于酶分子上，并参与反应。如己糖激酶就有 ATP 和葡萄糖两个底物，有 ADP 和 G—6—P 两个产物。而且该酶对两个底物各有其特有的 K_m 值，这样的双底物反应速度，也能用以上相似的方法分析，本书不拟作详细介绍。

双底物酶促反应可包括三种不同类型，兹举例介绍如下。

1. 有序顺序反应 (Ordered sequential reaction)

有序顺序反应指两个底物与酶结合，以及两个产物从酶释放必需有严格次序，而且两个底物都必需与酶结合后才能释放产物。如苹果酸脱氢酶（EM）所催化的反应属于这一类。其过程可用下式表示：



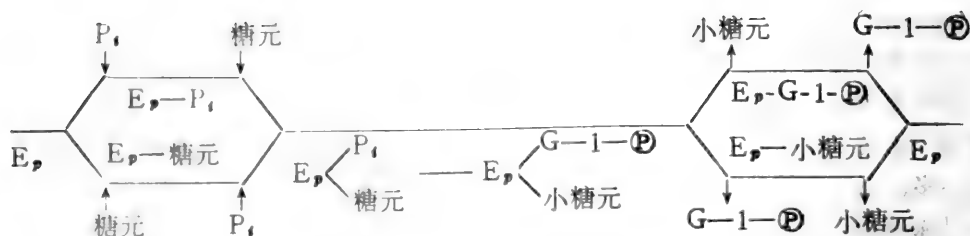
这类酶可用一个通式来表示它们的反应机制。



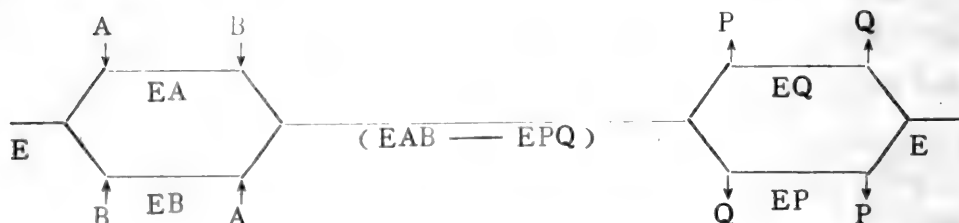
这个机制称有序顺序机制，由于反应中有三元复合物生成，又称三元复合物机制。

2. 随机顺序反应 (random sequential reaction)

这类反应机制与有序顺序反应一样必需两个底物都与酶结合后才能释放产物，但它又不同于有序顺序反应，两个底物可以任意次序与酶结合形成三元复合物，谁先谁后没有严格次序。产物的释放也是随机的。糖元磷酸化酶所催化的反应属于这一类。这类反应通式可表示



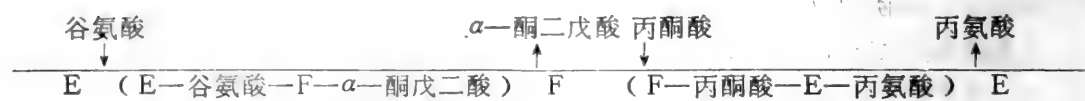
为:



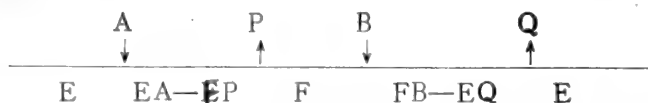
这一反应机制，也有三元复合物生成，属三元复合物机制。

3. 乒乓反应 (Ping pong reaction)

这一反应机制是先结合一个底物，释放一个产物。如谷丙转氨酶所催化的反应属这一类。



这类反应通式为:



这里 E 和 F 是酶存在的两种形式。

上述几种酶促反应的速度方程以及 K_m 和 V_{max} 等的求解与单底物反应类似，但进行动力学实验时是令一种底物浓度固定，而另一种底物浓度变化，从而测定不同浓度“变化底物”的初速度，用单底物反应相同方法推导速度方程以及用作图法求 K_m (变化底物时酶的 K_m) 和 V_{max} 。

二、pH 对酶促反应的影响

酶对 pH 极为敏感，每一种酶只在一狭窄 pH 范围内起催化作用，大部分酶都在一定 pH 下活性最大，该 pH 称为酶的最适 pH，大于或低于该 pH 范围，酶促反应速度即下降。图 6—15 是大部分酶的 pH—酶活性分布图，为钟罩形曲线。图 6—16 是一些特殊酶的 pH—酶活性分布图。其中有些酶如木瓜蛋白酶其活性不受 pH 影响，而蔗糖酶在一定 pH 范围酶促活性不受 pH 影响，有些酶如胃蛋白酶最适 pH 在酸性范围 (pH 1.5—2)，另一些酶如胆碱酯酶，最适 pH 在碱性范围 (pH 9—10)。在活细胞中一个酶的最适 pH 不一定与其正常生理 pH 相等，在一定生理 pH 条件下，有些酶可能刚好处于最适 pH，而有些酶则处于

高于或低于最适 pH。因此它们的催化活性不同。所以通过细胞周围介质 pH 的改变，各种酶的催化活性可部分地得以调节。表6—6是一些酶的最适 pH。

酶的催化活性为什么会受 pH 影响？每一个酶为什么有一个最适 pH？主要原因可作如下解释。

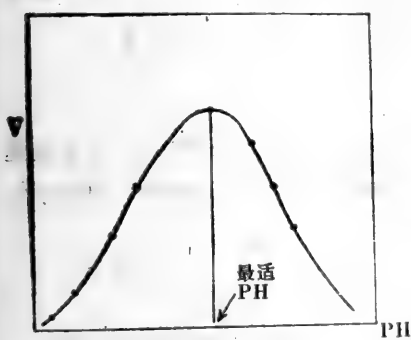


图6—15 大部分酶的 pH—酶活性分布图（钟罩形曲线）

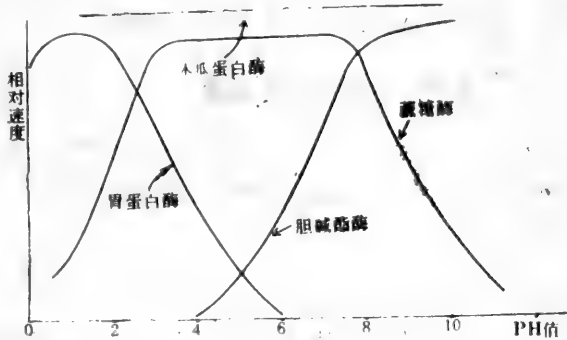


图6—16 一些酶的 pH—酶活性分布图

在一酶促反应中，自由酶、底物或酶——底物复合物都可能因环境 pH 的改变而导致电离状态的改变。对酶来说有许多因子可影响其最适 pH，其中包括活性部位的一些酸性基团。如果一个酶的催化作用需要一个质子化的酸性基团起共轭酸催化作用，则酶在 pH 值低于该基团的 PK 值时会显最大活性；相反如果需要一个解离态的酸负离子起碱催化或亲核催化作用，则酶在高于该基团 pK 值的 pH 环境中，才会产生最大催化活性。如果酶和底

表6—6 一些酶的最适 pH

酶	底物	最适 pH
胃蛋白酶	卵白蛋白	1.5
	酪蛋白	1.8
	血红蛋白	2.2
	苄氧羰基谷氨酰酪氨酸	4.0
α-葡萄糖苷酶	α-甲基葡萄糖苷	5.4
	麦芽糖	7.0
尿酶	尿素	6.4—6.9
胰蛋白酶	蛋白质	7.8
胰 α-淀粉酶	淀粉	6.7—7.2
麦芽 β-淀粉酶	淀粉	4.5
羧肽酶	各种底物	7.5
血浆碱性磷酸酯酶	2-甘油磷酸	9—10
精氨酸酶	精氨酸	9.5—9.9

物结合时有离子键生成，则环境的 pH 必需使酶和底物解离成不同的离子状态，才能达到酶

的最大催化活性。如表6—6中精氨酸酶的最适 pH = 9.5—9.9, 该酶只有在 pH = 9.5—9.9 的介质中才刚好使精氨酸解离成正离子, 而精氨酸酶则解离成负离子, 这时酶和底物形成离子结合, 酶促反应速度最大。

酶常常有两个或两个以上的酸性基团参与活性部位中, 而其 pH—酶活性曲线将会反映每个基团的 pH 依赖关系。研究 pH 对酶促反应速度的影响, 再加上其它一些信息, 确实有助于鉴定酶活性部位一些基团的性质。

三、温度对酶促反应的影响

众所周知, 一般化学反应的反应速度随温度升高而加快, 温度每上升 10℃, 化学反应速度可增加 2—3 倍, 即 $Q_{10} = 2-3$ 。温度对化学反应速度的影响也可用 Arrhenius 方程表示。

$$2.3 \log k = B - \frac{E_a}{RT} \tag{6-7}$$

式(6—7)中 k 为反应速度常数, T 为绝对温度, R 为气体常数 (等于 1.98 cal/mol/℃), E_a 为活化能, B 是一个常数, 它定性地表示碰撞频率, 以及碰撞分子间特异的定向的必需条件。图6—17是在 5—25℃ 范围内羧肽酶催化两个不同底物苄氧羰基-甘氨酸-苯丙氨酸 (CGP) 和苄氧羰基-甘氨酸-色氨酸 (CGT) 水解的 Arrhenius 图 ($\log k$ 对 $\frac{1}{T}$ 所作的图)。从图的直线斜率可算出 E_a 。

所以酶促反应也和一般的反应一样, 在一定温度范围内酶促反应速度也随温度升高而加快。从上述羧肽酶水解 CGP 和 CGT 的 $\log k$ 对 $\frac{1}{T}$ 作图有线性关系证明了这一点。另外从胰蛋白酶在 0—50℃ 范围内水解蛋白质为例, 当温度升高时底物水解时间可以缩短的实验数据也证明这一点。但在酶促反应温度超过一定范围后, 如果继续增加温度, 则羧肽酶和

温度℃	0	10	20	30	40	50
水解蛋白(分)	180	100	60	40	20	10

所需时间

胰凝乳蛋白酶所催化的反应速度不仅不会再线性增加, 反而会随升温而下降。温度-反应速度呈钟罩形曲线 (图6—18)。即酶促反应有一最适温度, 在该温度下, 酶促反应速度最大。酶促反应为什么会有一最适温度? 为什么高于或低于最适温度酶促反应速度都会下降? 这得从两个方面来理解。一是增加温度会增加反应速度, 这是化学反应的一个共同特点, 酶促反应也不例外; 二是酶的化学本质是一个蛋白质, 蛋白质都有其一定的空间结构, 温度太高, 酶空间结构会发生改变而变性, 变性酶的催化活性将会降低, 因而超过一定温度后, 随着温度上升, 酶变性速度加快, 其催化活性也迅速下降。所以酶促反应的最适温度是两个因素作用的总结果。在较低温度下, 第一个因素起作用, 而酶的变性速度很慢, 总趋势是温度上升, 酶促反应速度逐渐加快。当反应速度达到最高值时的温度称为酶的最适温度。超过最适温度后, 虽然升温也带来反应速度的增加, 但由于酶的变性速度加快, 酶的催化活性迅速丧失, 这时因升温而使反应速度的增加远比因酶变性而使反应速度下降的量小得多, 所以整个趋势是下降。

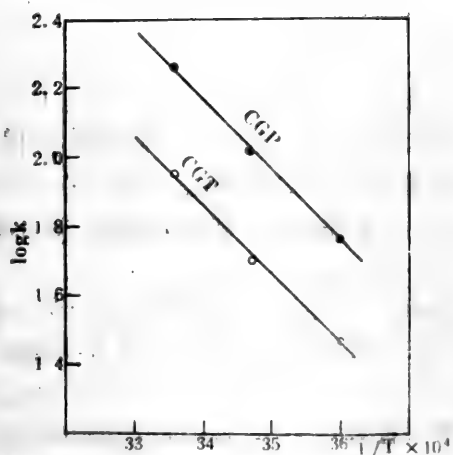


图6—17 羧肽酶催化苄氧羰酰-甘氨酸-苯丙氨酸和苄氧羰酰-甘氨酸-色氨酸水解时 $\log k$ 对 $\frac{1}{T}$ 所作的图

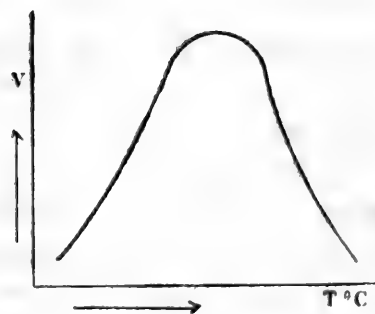


图6—18 一般酶的温度与反应速度关系图

各种酶由于结构不同，其最适温度也有差异。但大部分动物来源的酶，最适温度在 35°C — 40°C 。而植物来源的酶最适温度在 40°C — 50°C 。有少数酶最适温度可达 90°C 以上，如细菌淀粉酶最适温度为 93°C ；牛胰核糖核酸酶最适温度也很高， 100°C 仍不失活，这类酶有较大的工业应用价值。

最适温度并不是一个酶的特征性常数，它随作用时间而变。在较短时内，酶可耐受高温，而延长作用时间，最适温度将向低温方向移动，如图6—19。在发酵

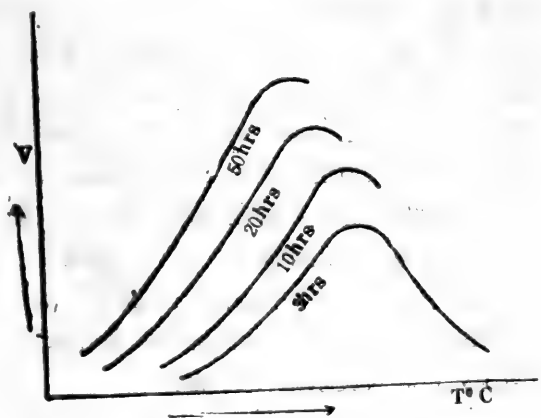


图6—19 酶的最适温度与作用时间关系

工业上常根据酶的最适温度、工序时间长短而决定该工序应采用温度。

四、抑制剂对酶的抑制作用及其动力学

抗菌素、抗病毒药剂、抗肿瘤药物、杀虫剂、除草剂等都是人们熟知的药物。这些物质的作用有许多是由于干扰细胞内酶的作用，且往往是干扰某一种专一性酶的作用，即对酶有抑制作用。对酶的抑制作用在自然界也常常发生，从而作为生物调节剂起作用。在实验室通过对酶抑制作用的研究，可以了解到酶的催化机制，这尤其有助于研制更有效的药物。

按抑制剂与酶结合的情况不同，可分为可逆抑制和不可逆抑制两类作用。

(一)可逆抑制作用

按可逆抑制剂对酶催化的影响不同，又可分为许多类。现集中介绍竞争性、非竞争性和

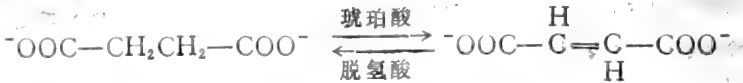
反竞争性三类。

1. 竞争性抑制作用 (Competitive inhibition)

竞争性抑制剂可与底物竞争地结合于酶的活性部位。当三者同时存在时会有 ES 和 EI 同时产生,但不能生成 ESI. EI 不象 ES, 不能分解成产物, 因此有抑制剂存在时, 酶促反应速度将会下降。如果这时增加底物浓度, 酶的催化活性又得以恢复。例如在一给定[S]浓度和一给定[I]浓度下, 酶的催化活性被抑制50%, 如果这时提高[S]浓度, 则可减少酶促反应被抑制的百分数。

从结构来看, 竞争性抑制剂的结构往往与底物相似。就由于有这种相似性, 它会冒充底物与酶的活性部位结合。一旦结合形成 EI 后, 由于 EI 不能分解成产物, 所以能与 S 结合的酶就会减少, 因而反应速度降低。

竞争性抑制作用的经典实例是丙二酸对琥珀酸脱氢酶的抑制。该酶催化琥珀酸脱去两个氢原子生成反丁烯二酸。丙二酸类似琥珀酸, 带有两个可解离的 COO^- (在生理 pH 下),



但它又不同于琥珀酸, 两个 COO^- 连在同一碳原子上, 不可能进行脱氢而成一定产物。当丙二酸与酶结合后, 如果增加琥珀酸浓度, 丙二酸又可从酶上释放, 使酶恢复催化活性。其它化合物只要含有两个相隔一定距离的负离子基团, 同样也可作为琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制剂, 如草酰乙酸就是其中之一。从这些抑制剂结构的比较中可设想琥珀酸脱氢酶的活性部位应有两个具适当距离的正电荷基团, 能结合琥珀酸的两个带负电荷的 COO^- (如图6-20)。所以对酶竞争性抑制作用的研究, 有助于了解酶活性部位的性质。除了琥珀酸脱氢酶这个经典实例外, 近年来已发现许多药物是一些酶的竞争性抑制剂。如磺胺药物之所以能杀菌, 是由于它们的结构类似于对氨基苯甲酸 (PABA), 因而能抑制细菌叶酸合成步骤中结合 PABA 的酶的活性, 从而降低细菌叶酸水平, 随之降低核酸的生物合成, 最后导致感染细菌的死亡。其关系见273页首:

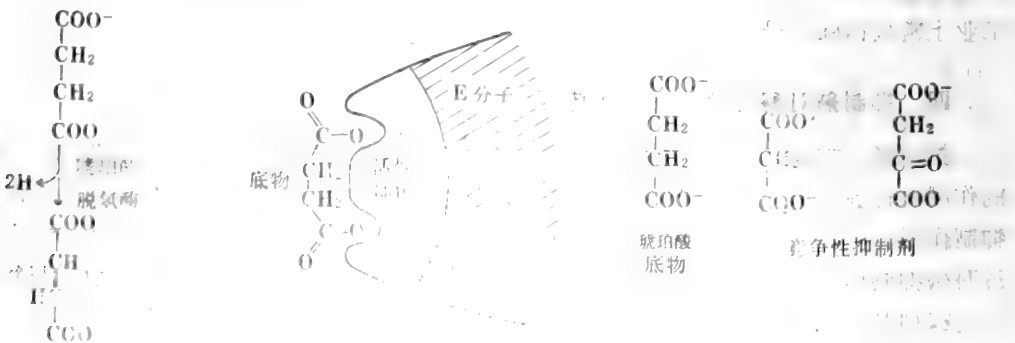
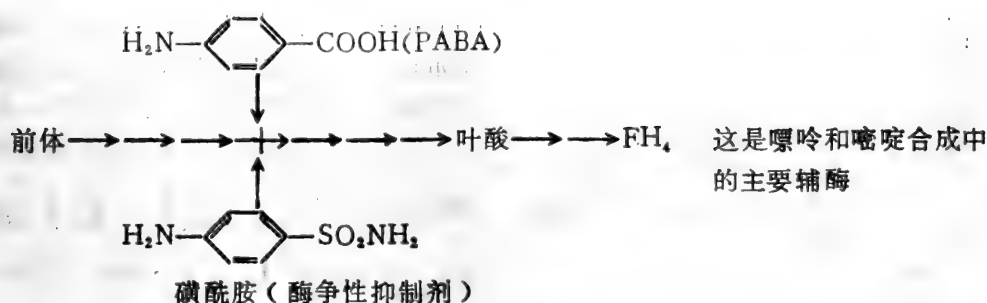


图6-20 琥珀酸脱氢酶与琥珀酸的结合示意图



此外还有别嘌呤醇可医治痛疯，5-氟尿嘧啶可治疗癌症都与这些药物可作为某酶的竞争性抑制剂有关。

竞争性抑制作用可按同样方法推导出米氏速度方程，而得出如下双倒数方程：

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (6-8)$$

通过有无抑制剂存在，或在不同浓度抑制剂存在下，测不同底物浓度时的反应速度，取各数据的倒数，将 $\frac{1}{v_0}$ 对 $\frac{1}{[S]}$ 作图，可得一系列直线，它们相交于 $\frac{1}{V}$ 轴上。这是竞争性抑制作用的表征（见图6-21）。其所以得到这样的图，是因为竞争性抑制作用可被底物所解除，所以它不会影响酶促反应的 V_{\max} ；因此不管有无抑制剂或抑制剂多少， V_{\max} 总不会改变，所以 $\frac{1}{v_0}$ 对 $\frac{1}{[S]}$ 作图所得直线都交于纵轴上同一点。

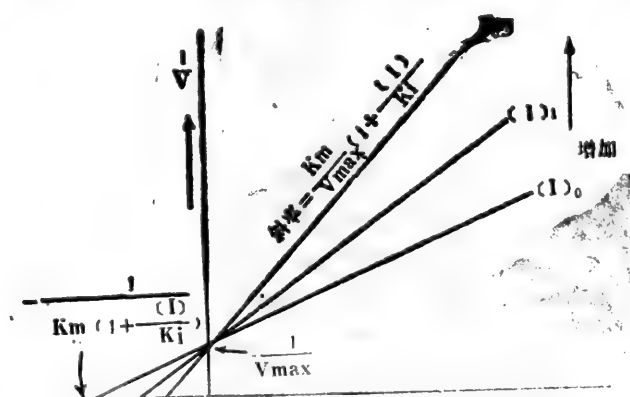


图6-21 有竞争性抑制剂存在下依实验数据所作的双倒数图

2. 非竞争性抑制作用 (noncompetitive inhibition)

非竞争性抑制剂结合于酶活性部位以外的一个部位上。它一旦结合后，则酶分子发生构象变化，造成酶的催化部位可逆地失活。非竞争性抑制剂 I 可与 E 结合也可与 ES 结合，底物 S 可与 E 结合也可与 EI 结合。即二者对酶的结合互不妨碍，即 I 并不影响酶—底物结合

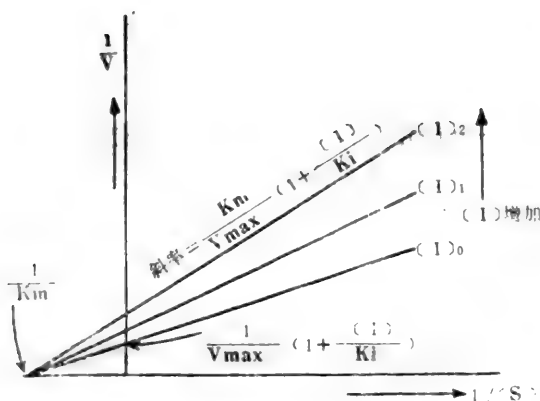


图6-22 有非竞争性抑制剂存在下根据实验数据所作的双倒数图

异亮氨酸可作为非竞争性抑制剂，抑制 L-丝氨酸脱水酶的活性，这是一个典型实例。

3. 反竞争性抑制 (Uncompetitive inhibition)

这一类型的抑制作用，抑制剂 I 只可逆地与 ES 结合形式 ESI，ESI 不能分解成产物。其双倒数方程为：

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{k_i} \right)$$

其双倒数图示于图6-23。这一类型的抑制作用多见于双底物或多底物的酶促反应。

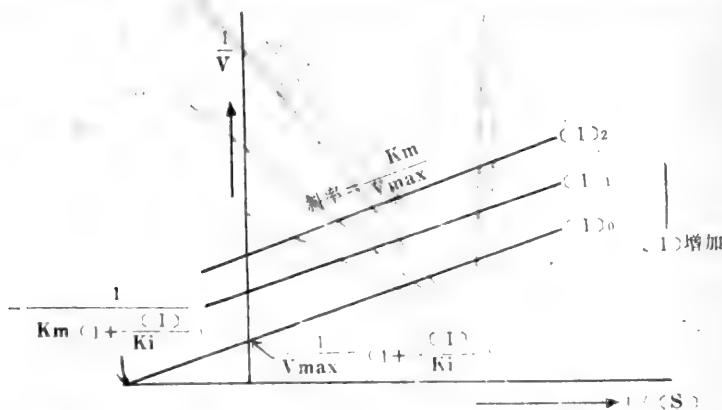
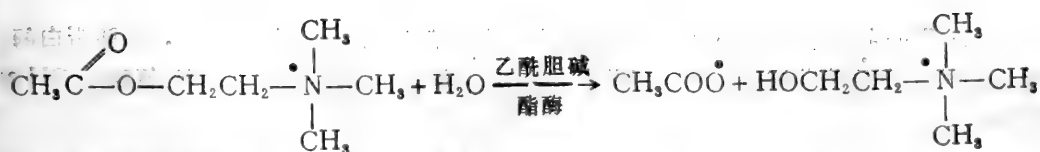


图6-23 有反竞争性抑制剂存在下，对实验数据所作的双倒数图

(二)不可逆抑制作用 (irreversible inhibition)

许多抑制剂不可逆地与 E 或 ES 结合，这种类型的抑制剂常与 E 或 ES 共价结合，永久地改变酶的活性构象，封锁酶的活性基团。典型实例如二异丙基磷酸酯 (DFP)，它是乙酰胆碱酯酶和许多丝氨酸蛋白酶的不可逆抑制。兹就乙酰胆碱酯酶进行讨论。该酶在乙酰胆碱传递神经脉冲中起重要作用。可催化神经递质—乙酰胆碱水解成无传递活性的乙酸和胆



碱。DFP 可与该酶活性部位的一个丝氨酸侧链 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 的 $-\text{OH}$ 形成 共价磷酸酯键（如图 6-24），使酶分子不能再行使其催化功能，因而造成乙酰胆碱堆积，神经脉冲传递失调，引起一系列神经中毒现象。

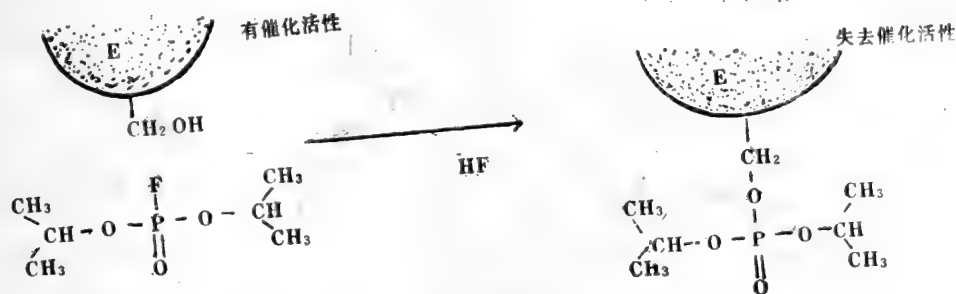
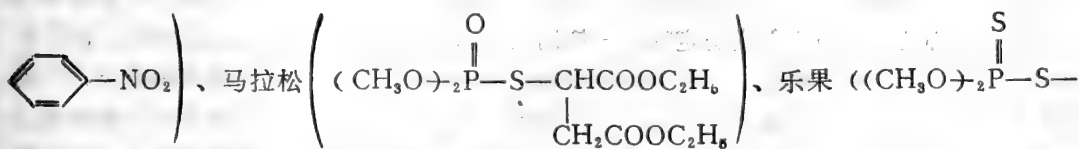
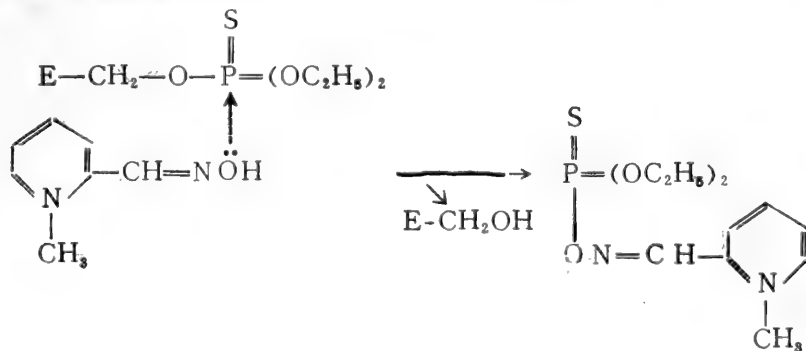


图6-24 DFP 与乙酰胆碱酯酶形成共价复合物
E 为乙酰胆碱酯酶

对这类抑制作用的研究，找到了一系列 DFP 的类似物。如 E_{605} $\left(\text{C}_2\text{H}_5-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)-\text{O}- \right.$

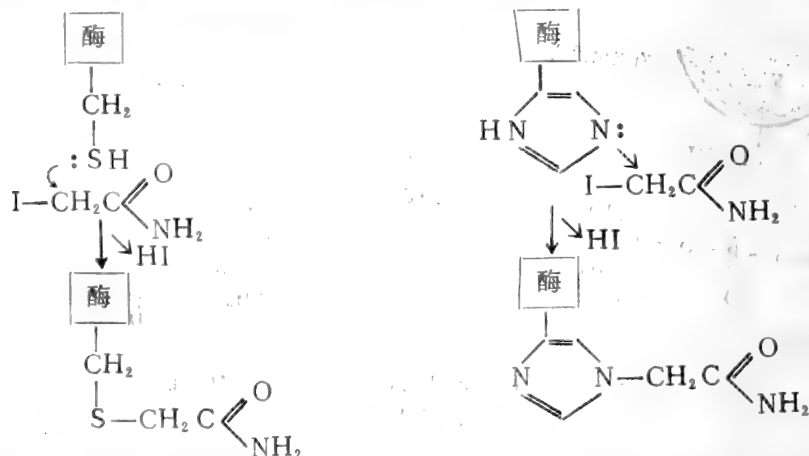


$\left. \text{CH}_2\text{CONH}-\text{CH}_3 \right)$ 等，已广泛用作农业杀虫剂。它们都和 DFP 一样，能与昆虫体内的胆碱酯酶的丝氨酸 $-\text{OH}$ 形成共价键，使昆虫的神经脉冲传递失调而死亡。为了解除这类农药对人类的毒害，近年来获得了一种比丝氨酸 $-\text{OH}$ 更强的亲核试剂——一种肟类化合物，它可亲核攻击抑制剂—酶复合物上的磷原子，使 这些抑制剂从酶分子上置换出来，从而 解除抑制，免于中毒。其机制如下式：

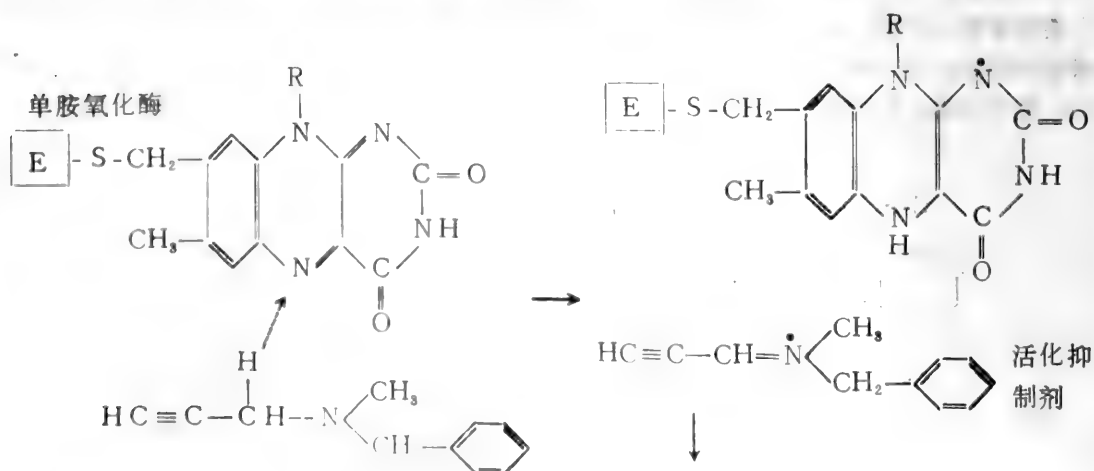


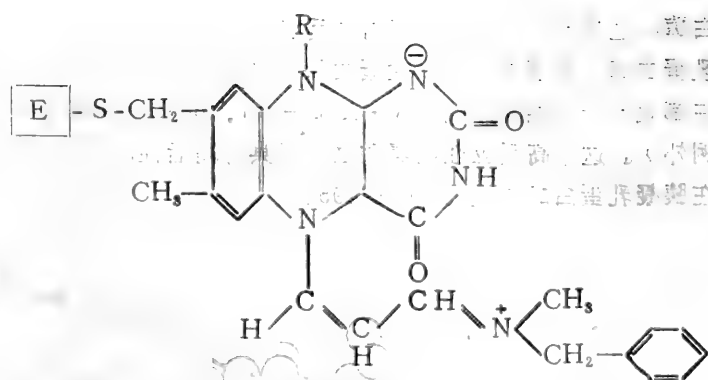
DFP 类不可逆抑制剂对所有以丝氨酸残基为催化基团的酶都有抑制作用，如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、磷酸葡萄糖变位酶、蚕茧酶等。这些酶的活性部位都有一丝氨酸—OH 参与催化作用。

另外还有一种酶的不可逆抑制剂 $\text{ICH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$ (或 $\text{ICH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OH}$)，它可与酶活性部位某半胱氨酸的—SH 或某组氨酸的咪唑基共价结合。如下式。



通过酶的不可逆抑制剂的研究，近年来已设计出许多专一性的酶抑制剂，用于治疗各种疾病，疗效明显。其中最重要最有价值的一类不可逆抑制剂，又称自杀底物，它不仅能与酶形成复合物，而且酶可对它进行催化作用，形成一种具有高度活性的产物。该产物旋即作用于酶的活性中心基团，与之形成稳定的酶—抑制剂共价复合物，使酶失去催化活性。由于该抑制剂象底物一样可被酶催化，故名为自杀底物。如近年来出现的一种新药叫迫降灵，可治疗高血压。它是一类叔胺的炔类衍生物，可与体内催化组胺等单胺氧化的单胺氧化酶作用。单胺氧化酶把它误认为是自己的底物—单胺，对它进行催化氧化，使它转变为有高度反应性的炔化合物。这类炔化合物旋即与酶形成共价结合，反应机制如下式。





单胺氧化酶—抑制剂共价复合物

第七节 酶活性部位的本性和酶的作用机制

酶活性部位功能基的鉴别，酶—底物间所存在的相互作用类型以及酶可能的催化机制等，都需要用多种手段来探索。比较有抑制剂存在时酶的三维结构，可获得许多这方面的信息。对这样一些结构的了解只可能从 x-射线晶体学与酶的全序列分析而获得。但并非所有的酶都能用此方法进行分析。因此需要用其它实验手段来阐明这些晶体结构。

关于一个酶的许多信息及其作用机制，也能从底物专一性的测定、抑制剂的性质，以及通过 pH、温度、溶剂组成等对酶催化活性影响的动力学分析而获得。另外用化学试剂来共价修饰酶上的专一性侧链，或用蛋白酶专一性地切去一个或多个肽键以观察酶活性如何受这些修饰作用的影响，也可探明许多信息。

这里介绍几种不同的酶，如 α -胰凝乳蛋白酶、核糖核酸酶、溶菌酶、羧肽酶、乳酸脱氢酶等。这些都可作为用多种手段来探测酶结构—功能关系的良好实例。这些酶的完全结构或大体结构已经确立，因此研究其活性部位的结构和底物结合的模式已有可能。它们的催化活性也已作过详尽研究，并且根据这些另加信息已提出了酶的可能的作用机制。

一、 α -胰凝乳蛋白酶

丝氨酸蛋白酶包括 α -胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、弹性蛋白酶和几种凝血酶，它们共有许多结构和功能特性。 α -胰凝乳蛋白酶是这类酶中研究得最完全的一员，本书将以它为例来说明这类蛋白酶的催化机制。

α -胰凝乳蛋白酶的三维结构示如图6-25。它含有 A、B、C 三条肽链，结构与弹性蛋白酶和胰蛋白酶很相似，但与丝氨酸蛋白酶—枯草杆菌蛋白酶不同。然而所有丝氨酸蛋白酶基本上都以相同机制起催化反应，在催化过程中形成一酰化酶共价中间物。一种丝氨酸蛋白酶与另一种丝氨酸蛋白酶不同之处主要在于其决定底物专一性的部位不同。

胰凝乳蛋白酶催化机制的导出，首先是用化学修饰法鉴定出了第一个活性部位侧链—丝氨酸。胰凝乳蛋白酶共有28个丝氨酸，当用二异丙基磷酸酯(DIFP)与酶反应后，只有一个丝氨酸与酶结合形成 DIP—酶，酶完全失活。而且热失活的酶不能与 DIFP 反应，从而证明这个与 DIFP 反应的丝氨酸处于该酶的活性部位。所有能形成酰化酶共价物的丝氨酸蛋

白酶，也都能与DIFP起相同的反应。经氨基酸序列分析，这个活性部位中的丝氨酸在胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、弹性蛋白酶、凝血酶、血纤维蛋白溶酶等所形成的DIP-酶复合物中都处于一个相同序列 Gly—Asp—Ser. p—Gly—Gly—Pro 中（但在枯草杆菌蛋白酶中例外）。这个高反应性丝氨酸之所以具有高活性，与它处于各酶活性部位的特殊环境有关，在胰凝乳蛋白酶中它为 Ser—195。

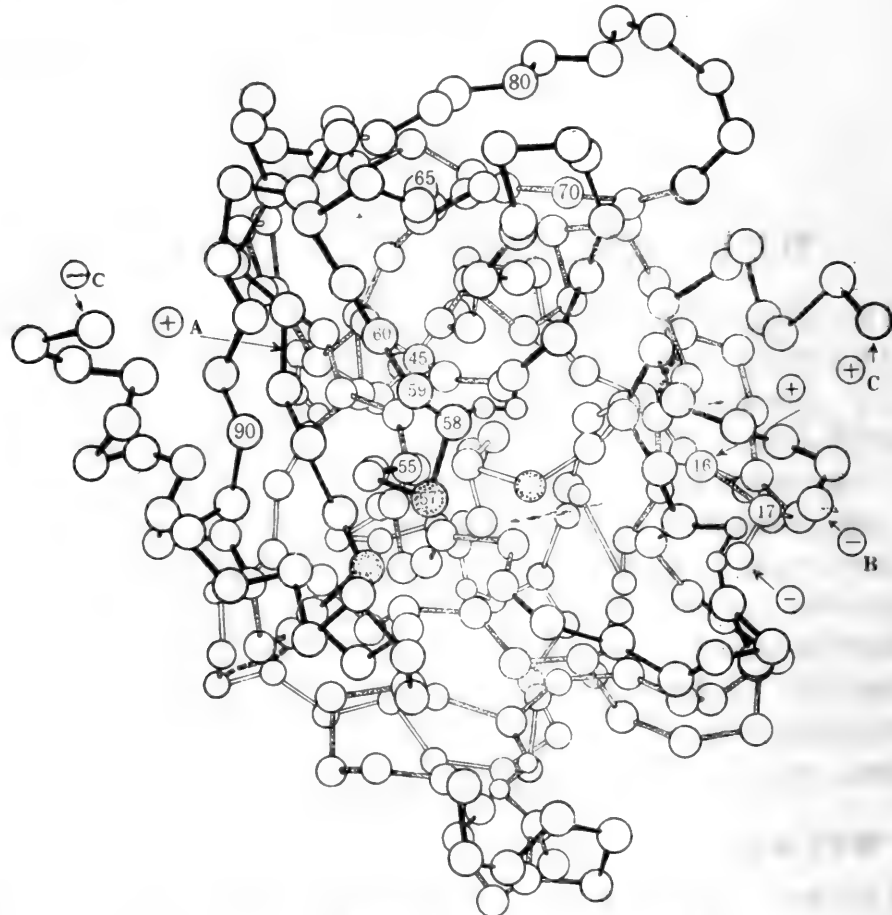


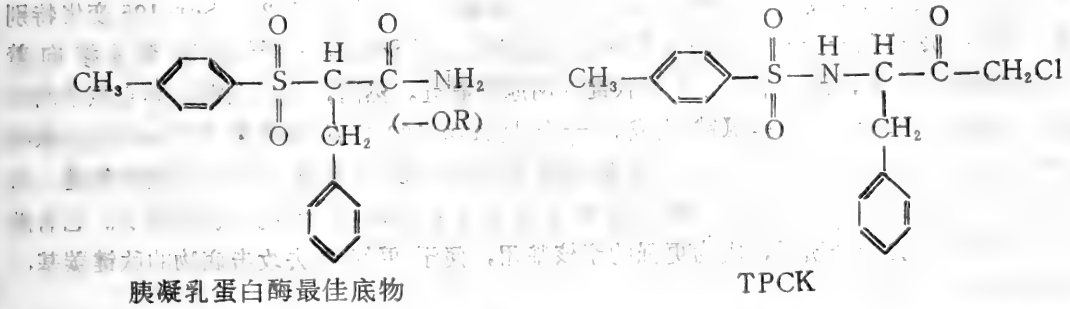
图6-25 α -胰凝乳蛋白酶，的三级结构示意图

当用 L-1-(对甲苯磺酰) 胺-2-苯乙基-氯甲酮(TPCK)处理胰凝乳蛋白酶后，酶的失活量与 TPCK 的共价参入量相平行。TPCK 与酶的最佳底物对甲苯磺酰-L-苯丙氨酸酰胺或甲酯相比非常相似，只是 其以 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 取代了 $-\text{NH}_2$ 或 $-\text{OR}$ 基团。因此 TPCK 和底物一样与酶结合后可释放大量能量，而且与酶活性部位具有很高的亲和力。但由于它含有高活

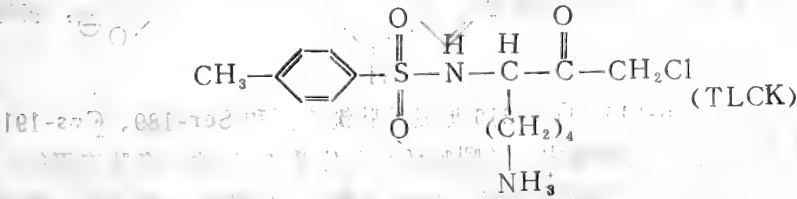
性的一 $\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{Cl}$ 基团，当它与酶结合后即可与酶活性部位的一个亲核基团反应。经研究

发现这亲核基团是酶活性部位的一个 His₅₇ 的咪唑 N-3，它可攻击 TPCK 中一 $\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{Cl}$

的羰基碳。这个 His₅₇ 处于酶的 Ala—Ala—His—Cys 序列中，而且发现其它丝氨酸蛋白酶都有与此相同的序列。



TPCK 是对胰凝乳蛋白酶绝对专一的抑制剂，它不与胰蛋白酶反应。后来根据胰蛋白酶对碱性氨基酸的专一性，设计了一个相似的专一性抑制剂—L-5-氨基-1-(对甲苯磺酰)-胺-戊基-氯甲酮(TLCK)。



它是以 $-(CH_2)_4NH_2$ 代替了 TPCK 中的 $-CH_2-C_6H_5$ ，从而适应于胰蛋白酶对碱性氨基酸的需求。因此 TPCK 和 TLCK 称为酶活部位亲和标记试剂。目前已找到了许多其它酶的亲和标记试剂，这对鉴定酶活性部位各种残基特别有用。

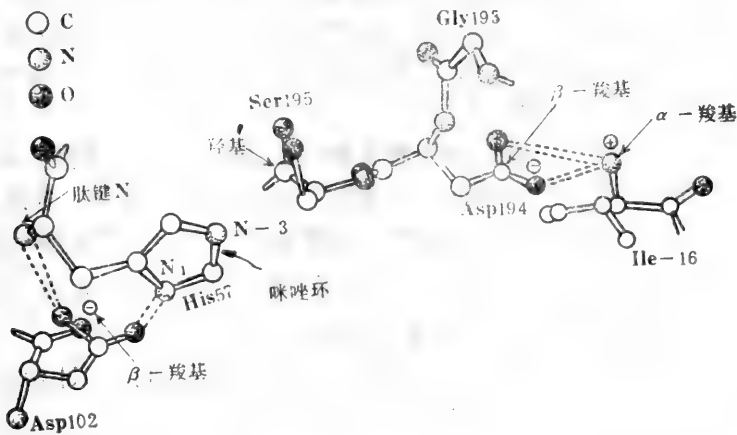
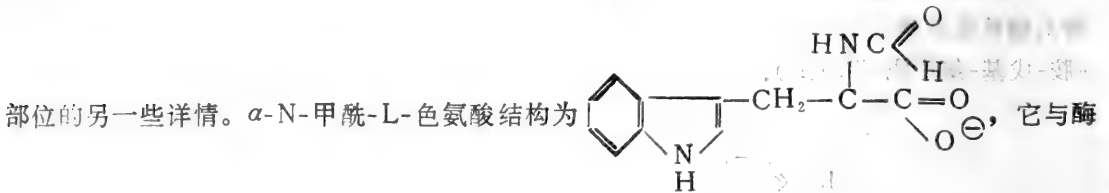


图6-26 胰凝乳蛋白酶活性部位结构图

x-射线结晶学已证实，在胰凝乳蛋白酶晶体中 Ser195 和 His57 处于非常邻近位置，这与化学修饰法预计的活性部位结构一致（如图6-26）。此外，从晶体结构中还发现了其它一

些重要的结构信息。第一是 Ile-16 的 α -氨基，它是酶中 B 链的 N-端 —NH_2 ，是酶原激活后形成的。其形成后即与 Asp194 的羧基形成离子对，这个离子对的形成是酶原活化的关键性步骤。它导致各部位发生小的但是非常重要的重排作用，Met-192 和 Ser-195 变化特别显著。Met-192 移到一个许可底物芳香环的结合部位，而 Ser 的 —OH 则移至直接向着 His-57 咪唑 N-3 处，但并不充分与其肽键的两原子靠近。然而，从所测得的其它原子间的距离，推测那个部位还有一些氢键生成。一个是 Asp-102 的 β -羧基氧和 His-57 的咪唑 N-1 间的氢键，另一个则是 Asp-102 的 β -羧基氧和 His-57 的肽键 —NH— 间的氢键。这样所形成的氢键结构的有序排列，称为电荷接力系统 (Charge relay system)。它有助于从 Ser-195 移去一个质子，成为更强的亲核基团，便于更好地去攻击底物的肽键羰基，形成酰化酶中间物。

比较 α -N-甲酰-L-色氨酸存在和不存在时胰凝乳蛋白酶的晶体结构，可观察到酶活性



结合后，即定位于 Ser-214、Trp-215、Gly-216 形成的肽键平面和 Ser-189、Cys-191 和 Met-192 所形成的肽键平面间的一个裂隙中。其吲哚环平面几乎与每边的多肽链平行，并形成疏水键，特别是与 Met-192 的结合更为显著。 α -N-甲酰-L-色氨酸的羧基氧，相当于敏感肽键的 >C=O ，直接对着 Ser-195 和 His-57，进入所谓的氧负离子穴 (Oxyanion hole) 中。

关于各种丝氨酸蛋白酶不同底物的专一性，也可从结构研究予以解释。 α -胰凝乳蛋白酶易接纳芳香环平面。而在弹性蛋白酶中，观察到这位置被 Val-216 和 Thr-226 等大基团所阻塞，不能让大的芳香环进入，只有小的基团如 Ala 的甲基可适于进入并与酶结合，这与弹性蛋白酶的专一性相符。胰蛋白酶在该部位含有 Asp-189，它的 —COO^- 允许 Arg、Lys 等的侧链进入其中并与之结合。

从以上结构信息和化学修饰等的结果可将胰凝乳蛋白酶的催化步骤分列如下：

①底物结合于酶活性部位形成米氏 ES 复合物。这一步包括酶的专一性基团与底物的相应基团相互作用。这些作用大部分发生在底物的酰基侧链上，它包括芳香环的结合也包括活性羰基氧对 Ser-195 和 Gly-193 的肽键 —NH— 间的氢键结合。这个活性 >C=O 的位置，群集各种结合部位，使 Ser-195 的 —OH 采取过渡态位置。

②过渡态中的 Ser-OH 攻击底物的活性羰基碳，同时 Ser-195-OH 转移一个质子到 His-57 咪唑 N-3 上形成一个四面体结构；而 His-57 的咪唑 N-1 上的质子则移向 Asp-102；在活性羰基氧上的负电荷与肽键 Gly-193 的 —NH— 形成较短而较强的氢键，帮助稳定过渡态结构。

③过渡态结构分解成酰化酶共价中间物，让离去基团扩散离去。

④酰化酶脱酰。电荷接力系统以②③逆反应形式给出酶—产物复合物，然后释放第二个

产物。总反应机制如图6-27所示。

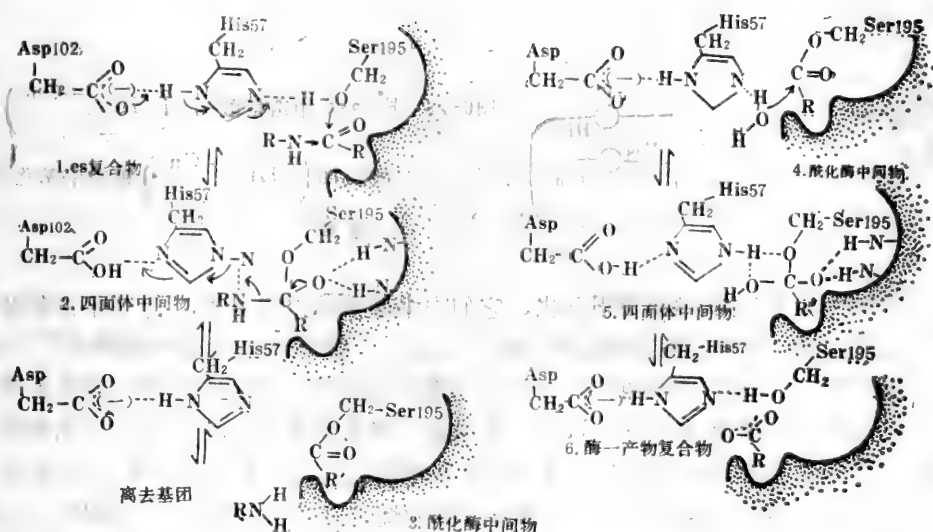


图6-27 胰凝乳蛋白酶的催化机制图

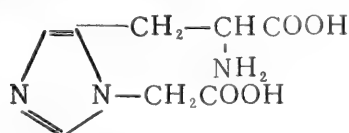
二、核糖核酸酶

该酶是由 124 个氨基酸单位构成的单肽链，含有四个链内二硫键。用枯草杆菌蛋白酶水解，使之在 Ala-20 和 Ser-21 之间被切断，被切断的酶蛋白仍有催化活性，称为 RNase-S。这时被切下的一段二十肽，仍非共价地结合在剩余的酶蛋白上。前者称 S-肽，后者称 S-蛋白，在酸性 pH 下，二者解离，都失去活性，但在 pH7 下将二者混合时，又恢复 RNase-S 活性。

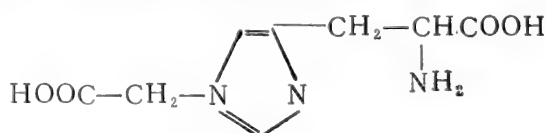
一合成肽与 S-肽的 1—13 序列相同。将其加入到 S-蛋白中，可使 RNase-S 恢复 7% 的活性。但如果只合成 11-肽，将其加入到 S-蛋白中，则酶活性完全不能恢复。这说明 His-12 或 Met-13 在 RNase 催化中起关键作用；而二十肽的 14—20 个氨基酸残基，不直接包括在酶活性部位中。

用胃蛋白酶水解 RNase，切断了 Phe-120 和 Asp-121 间的肽键，除去了 C-端 121—124 一段肽链，酶即失活。用羧肽酶除去 RNase 羧端 Val-124，酶不失活；进一步水解除去 Ser-123，活性下降到 45%；再进一步经 Phe-20 消化，则酶完全失活。

pH5.5 是组氨酸被碘乙酸羧甲基化的条件。在 pH5.5 条件下，用碘乙酸使 RNase 羧甲基化，发现羧甲基化程度与 RNase 失活程度成正比，每分子酶只需要含有一个羧甲基基团，就会完全失活。羧甲基化的 RNase 用离子交换层析分离，观察到两种不同形式的酶。一个是在 His-12 上被羧甲基化，约占 15%；另一个则是在 His-119 上被羧甲基化，占 85%。这两种羧甲基化的 RNase 都无活性，而且没有发现含两个羧甲基的 RNase 生



N-1-羧甲基组氨酸



N-3-羧甲基组氨酸

成。两种含一个羧甲基的 RNase 结构不同，如上式。在 RNase 中，它们的 空间关系可表示如图6-28。



图6-28 RNase 中组氨酸-12 (His-Cm) 和组氨酸-119 (His-Cm) 被羧甲基化后的结构示意图

让两种羧甲基 RNase 继续羧甲基化，它们中未羧甲基化的基团，也都不再能被羧甲基取代。以上事实充分说明：酶与碘乙酸(IAA)的反应，是 His 作为亲核剂取代了 IAA 中活泼的 I，使酶烷化成了羧甲基衍生物。并且很显然，这两个组氨酸在酶活性部位非常邻近，任一个 His 的存在将会促进另一个 His 的烷基化，但不能两者同时烷基化。因此在酶活性部位中两个 His 之间的方向和距离，两个带电咪唑基之间的相互作用以及 IAA 所结合的位置都有利于酶的烷化作用的顺利进行。His-119 的烷化速度比 His-12 的更快，可认为在 pH5.5 条件下，His-12 由于所处环境及其 PKa 值比 His-119 高，因而主要以质子化状态存在，His-119 的 PKa 值比 His-12 低。后来经研究知 His-12 和 His-119 的 PKa 值各为 6.2 和 5.8，当它们结合羧甲基后则提高到 8.0 和 7.4。

RNase 在 50%HAC 中冷冻干燥形成二聚体，但仍有活性，将失活的 1-Cm-His-119 RNase 和 3-Cm-His-12 RNase 等量混合在 50%HAC 中冷冻干燥，则 25% 的羧甲基化酶二聚体具有非修饰酶一半的比活。这是由于冻干后的二聚体，可以三种形式存在，第一种是两

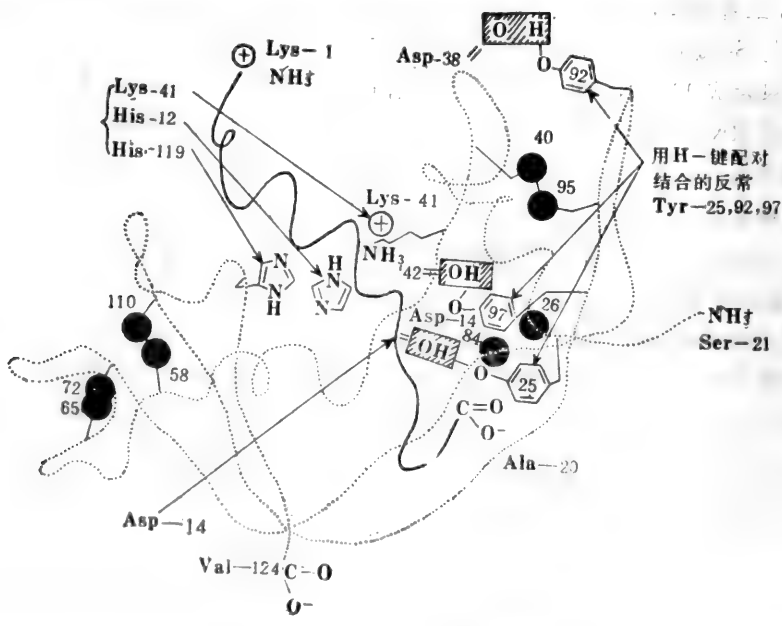


图5-29 RNase 构象示意图
图中示出活性部位的主要基团，如 His-12、His-119、Lys41 等的相对位置

个单体都含有羧甲基化的 His-12，第二种的两个单体都含羧甲基化的 His-119，而第三种则是一个单体的 His-12 羧甲基化，而另一单体的 His-119 羧甲基化。就是这第三种二聚体既有未被羧甲基化的 His-12，又有未被羧甲基化的 His-119。所以它具有 RNase 的活性。可见有活性的 RNase，必需两个 His 都处于自由状态。

RNase 和 RNase-S 晶体结构已经确定。它们不同之处只是 RNase-S 中有一个肽键已被切断。图6-29是个肾形分子，在一边有一显著凹陷，His-12 和 His-119 就定位于该处，研究在各抑制剂存在下的晶体结构，发现它们都结合在分子的同一边，靠近两个组氨酸。而且抑制剂在活性部位的定向虽不完全同于酶—底物复合物中底物的定向，但 His-12 和 His-119 似乎紧紧邻近于需水解的磷酸酯键。嘌呤和嘧啶环固定到特殊区域，在嘧啶环和 Thr-45 的—OH 和—NH—之间有氢键；Phe-120 处于嘧啶环的一边，而 Val-43 在另一边，这可解释为什么用胃蛋白酶除去120—124一段肽链后酶即失活。

有关 RNase 的催化机制目前有几种假设，其中之一示于图6-30。

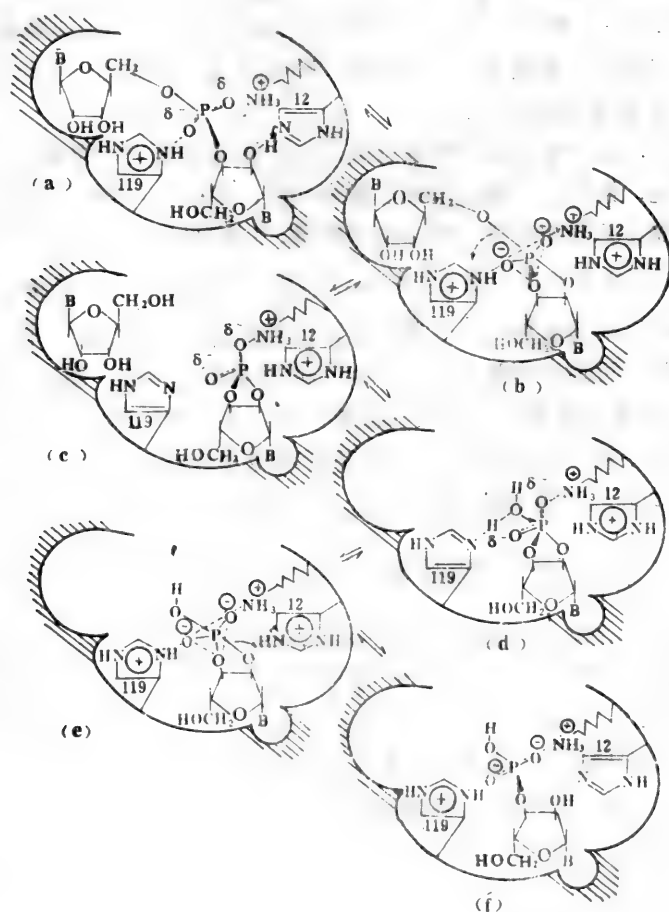


图5-30 RNase 催化机制图

在图6-30(a)中,酶活性部位的底物结合部位与嘌呤和嘧啶环紧密结合于酶的一个亚部位; Lys-41的 $\epsilon\text{-NH}_2^+$ 与两个His一起伸向带负电荷的磷酸氧;两个His采取一致行动, His-12起碱催化作用,接受核糖2'-OH上的质子,而His-119起酸催化作用,与磷酸上的一个氧原子形成氢键。然后如(b)所示,形成一过渡态复合物,它具有五配位磷原子(图中以三角锥体表示)。伴随从His-119除去一个质子,His-12则吸收一个质子,形成了2',3'-环磷酸中间物(c)。当 H_2O 到达活性部位时(d),它把一个质子交给His-119,而其—OH与(e)中的三角锥结构的磷原子作用。在酸性His-12的帮助下形成了3'-磷酸核苷酸产物。

三、溶菌酶(Lysozyme)

溶菌酶的最佳底物为N-乙酰葡萄糖胺(NAG)- β -1,4-N-乙酰-2-葡萄糖胺-3-乳酸(NAM)重复结合而成的杂多糖。一个较简单的底物为NAG的六聚体,经溶菌酶水解后断裂一个糖苷键,生成一个四糖和一个二糖。

鸡卵蛋白溶菌酶含有129个氨基酸单位。 α -射线晶体学研究证明,在酶分子表面有一较深的裂隙。用NAG—三糖与之结合,观察到该三糖的非还原端指向裂隙顶部,而还原端则指向裂隙下方。结合后在裂隙中的一些侧链有约 0.75 \AA 的小移动。可以设想底物与酶的结合后对酶产生了一种诱导契合作用。

通过建造模型,从三糖还原端继续安装一个个单糖残基进入裂隙中,以观察它们进入的可能性。结果发现,第四个糖残基加到三糖末端后,糖残基与酶的一些侧链由于过分拥挤,使该糖环从正常椅型构象扭曲成一种半椅型构象,以减少拥挤,这时糖的C—6和酶裂隙中的Asp—52的 >C=O 或Glu—35的 >C=O 可形成氢键。第四个糖单位安装好以后,第五个和第六个糖单位可很容易地一一安装上去,而且形成了许多氢键和非极性键,以稳定这种结合。六个糖单位即可填满裂隙全长,并且不可能再安装下去。图6—31是溶菌酶与六—NAG结合后酶的构象以及酶—底物间的接触状况。从 α -射线晶体学分析,观察到酶裂隙中D—E糖环结合区具有许多重要特点:Glu35和Asp52两个基团各分布于D—E间糖苷键的一侧,Glu35—COOH离糖苷键氧原子约 3 \AA ,Asp52—COOH离糖环C—1和环氧原子约 3 \AA 。这两个 $\text{—C}\begin{smallmatrix} \text{O} \\ \text{OH} \end{smallmatrix}$ 侧链所处的环境完全不同。Glu35处于特别疏水的环境中,与Ala110

和Trp108侧链相邻,在溶菌酶催化的最适pH5,它以质子化状态存在;而Asp52处于一个复杂的亲水的氢键网中,因此它以 —COO^- 离子存在。所以这两个基团是离糖苷键最近的酸碱基团,可以设想它们以协同催化机制起作用。另外,D—糖环处于扭曲状态,故更利于催化反应的进行。D—糖环扭曲所需的能量来自其它糖残基与酶结合时所释放的能量。

以上一系列的研究结果提出了溶菌酶的催化机制如下:

① 多糖以氢键或非极性疏水力结合在酶分子表面的裂隙中,裂隙可容纳一个六糖,用A—B—C—D—E—F表示,其中D糖环扭曲成半椅形,其它糖环都是取椅式构象。

② Glu35—COOH把—COOH的一个H给与D—E间糖苷键的氧原子,使糖苷键断裂,形成一个二糖产物而离去(即E—F二糖离去)。被切断糖苷键的D—糖残基C—1则以 $(+)$ 离子状态存在。

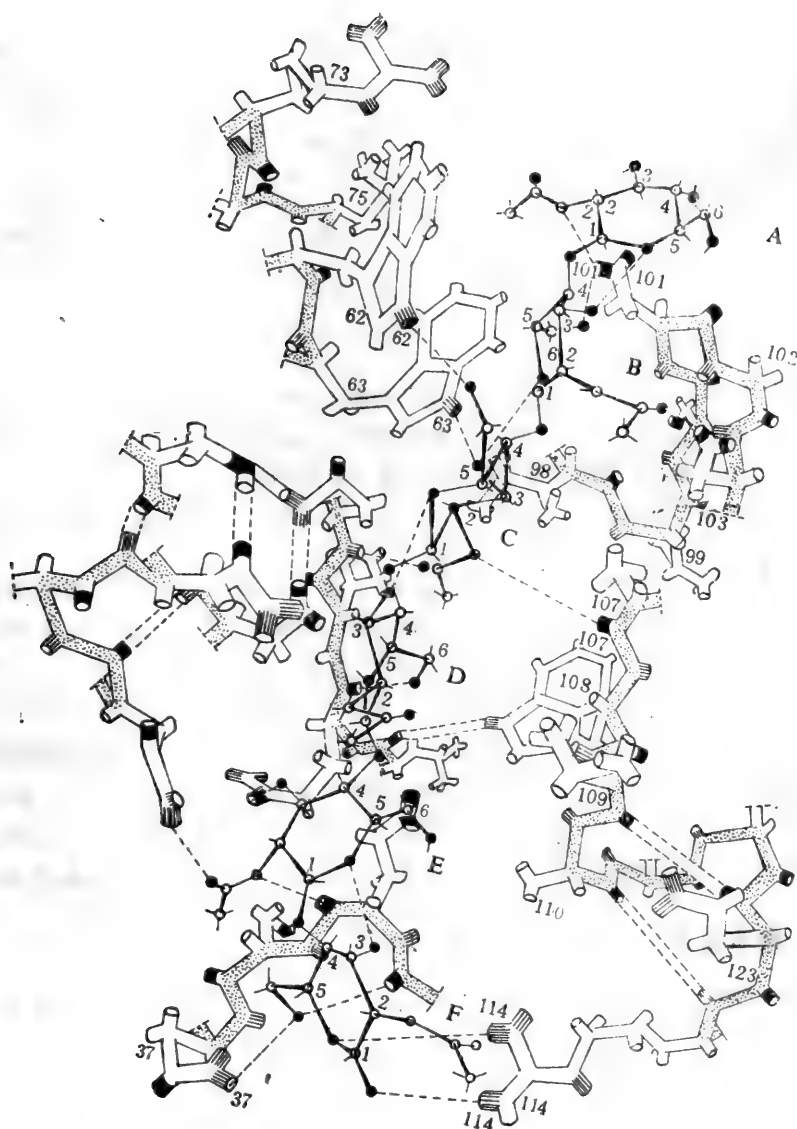


图6—31 溶菌酶与六一NAG 结合后的构象变化及酶—底物间的接触状态

③ 带负电荷的 Asp—52—COO⁻ 在糖苷键的另一侧，正好用来稳定扭曲的 D—糖环上的正碳离子。

④ 已失去 H⁺ 的 Glu—35—COO⁻ 又可起碱催化作用，吸引水分子中的一个质子，自己则恢复原状，而水分子中的 OH⁻ 基团，这时去亲核攻击 D—糖残基的 C—1 正碳离子，把 Asp52 解放出来。整个反应就此告终。整个反应示于图6—32。

从以上溶菌酶的催化机制看，其所以能加速糖的水解反应，下述因素都起了作用：专一性结合底物所释放的能量；扭曲一个糖环；底物诱导契合；Glu-35起酸催化作用；Asp52帮助过渡态形成正碳离子等。这个机制也已得到了其它方面的证实。如①当测定每一糖环的结合

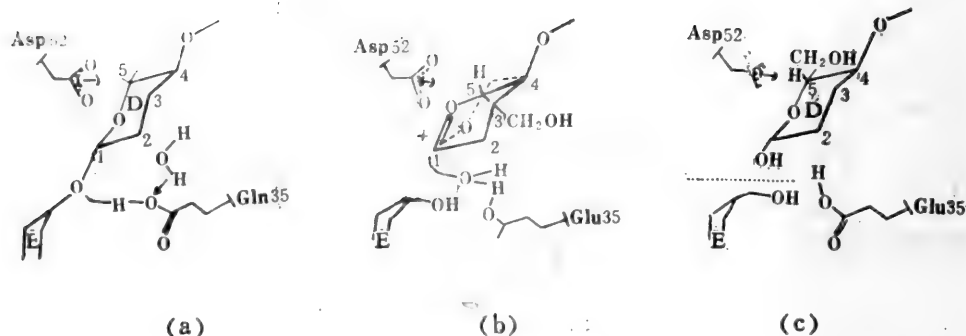


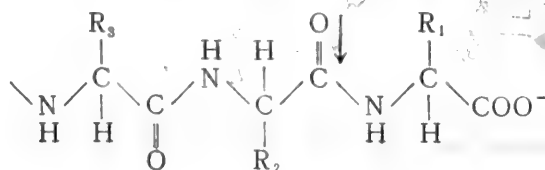
图6-32 溶菌酶的作用机制

随着底物结合(a)，使酶的 Asp52和 Glu35与它邻近，
它们帮助底物糖苷键断裂形成过渡态复合物(b)，
过渡态复合物与 H_2O 的 H^+ 和 OH^- 反应形成产物和原来的酶(c)

能时，发现除 D 环为负值外其它都为正值，这与 D 环变形为半椅型 构象需吸收能量有关。
②在底物存在下，溶菌酶中除 Asp52和 Glu35外所有其它羧基都能遭受化学修饰而不失活，
而在底物不存在时，Asp52 和 Glu35 的 $-COOH$ 也受到修饰，酶完全失活。这充分说明，
Asp52和 Glu35在溶菌酶催化中的重要作用。③一个四糖 NAG—NAG—NAG—N—乙酰葡萄糖酸内脂，其最后一个葡萄糖酸内脂环为半椅型结构，类似上述溶菌酶底物的D—环，就使该糖成为溶菌酶的强抑制剂，可见 D—环的扭曲对溶菌酶的催化也作出了重要贡献。④溶菌酶的最适 $pH=5$ ，大于或小于此值，其催化活性都会下降，这与高 pH 会使Glu35脱质子，而低 pH 则使 Asp52 质子化有关。这进一步证明 Asp52和 Glu35 在该酶催化中的作用。

四、羧肽酶 A (Carboxypeptidase A)

羧肽酶 A 水解 C—端带自由羧基的肽键，作用部位标在下式的箭头处。当 R_1 为芳香侧链



或大的烷基侧链时，水解速度大增。二肽是不适底物，但当其 N—端氨基酰化后，则成为最适底物。C—端氨基酸必需为 L—构型才能被水解。类似结构的酯亦能为该酶所催化水解。

羧肽酶 A 是一个金属酶，含有一个 Zn^{2+} 。除去 Zn^{2+} ，则酶失活，再加入 Zn^{2+} ，酶活性又恢复。 Zn^{2+} 在酶活性部位的作用早已提出，它在水解作用中的机制，证明与酶—抑制剂复合物的晶体分析相符。酶的化学修饰证明有一个 Tyr 残基可能包含在酶的催化中。

羧肽酶 A 完全的三维结构示如图6—33。

在抑制剂 Gly—Tyr 存在下，该酶所显示的活性部位的配置是一个浅槽，引导

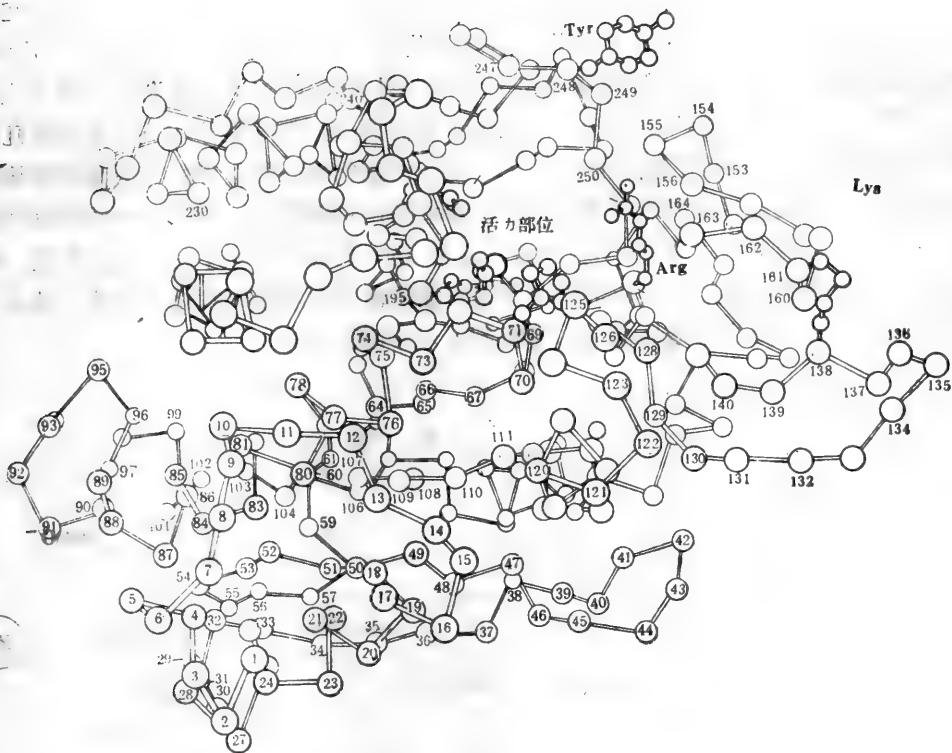


图6—33 羧肽酶的三维结构

Zn^{2+} 离子进入疏水口袋，抑制剂肽键的羰基氧直接指向 Zn^{2+} 。抑制剂在活性部位的取向示如图6—34。

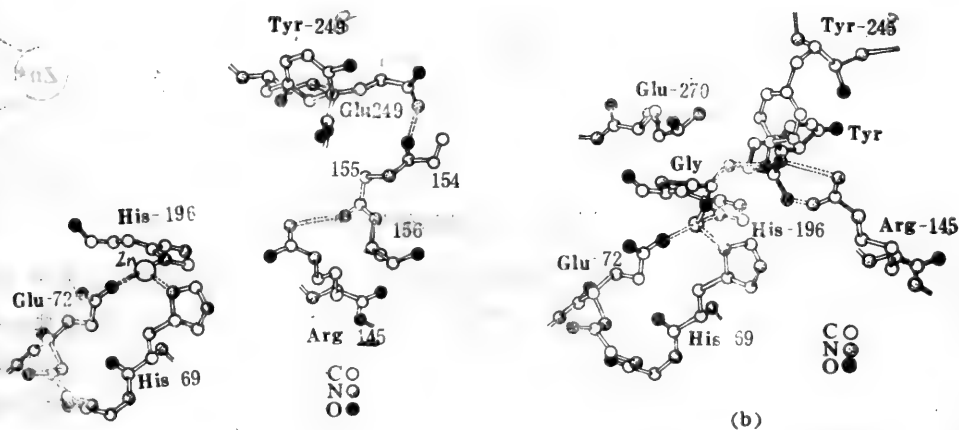


图6—34 比较无 Gly—L—Tyr 存在(a)与有其存在(b)时羧肽酶 A 活性部位的结构
Gly—Tyr 结合后，Glu270、Tyr248和 Arg145发生很大的重新定向。这明显地示于图(b)中。

最引人注目的是至少有五个水分子在底物结合时从活性部位排挤出来，其中包括一个水分子从 Zn^{2+} 离子上排挤出来。底物上主要的羧基结合在 Arg145 的胍基上，Gly—Tyr 的酚基结合于疏水口袋中， Zn^{2+} 离子是经 His69、Glu72 和 His196 等螯合到酶分子上去的。当 Gly—Tyr 不存在时， Zn^{2+} 的第四个配位为水所占据；三个配位体和一个水分子几乎是围绕 Zn^{2+} 呈四面体排列。而在抑制剂存在下，酶上的底物结合部位显然有大量的结构变化。这可认为是一个底物的诱导契合作用的结果。Arg145 约移动 2\AA ；Tyr248 约移动 12\AA ，使其酚—OH 带到底物敏感肽键的—NH—近旁；这个 Tyr 的移动，似乎是关闭这个穴，使它难以进入溶剂，酶之所以能加速反应的部分原因可能是由于这种脱溶剂化的缘故。从以上所观察到的一些现象有人提出了羧肽酶的水解机制（示于图6—35）。

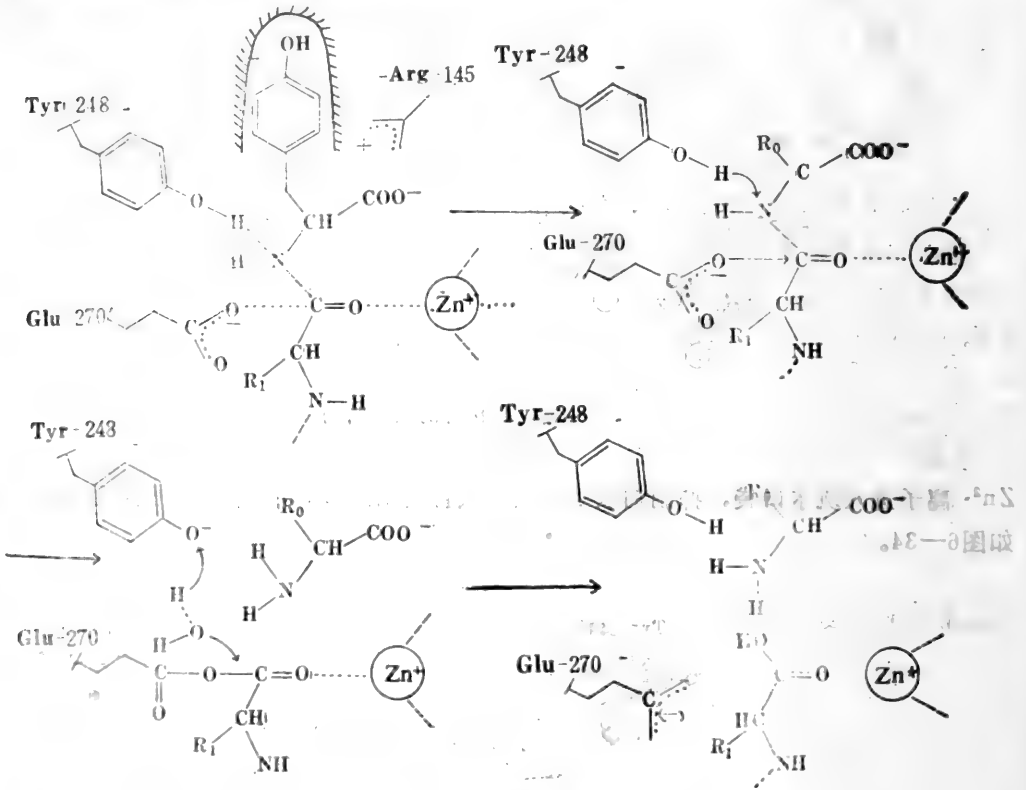


图6—35 羧肽酶催化机制图

从图6—35可见，Glu—270作为亲核试剂攻击底物羰基碳，形成酸酐中间物。 Zn^{2+} 作为亲电剂，极化底物羰基，使Glu—270的亲核攻击更易。Tyr248作为酸催化剂将其酚—OH上的一个质子交给敏感肽键的—NH—，使肽键断裂，一个氨基酸产物离去。参与反应的水分子把H⁺还给Tyr248—O⁻，使之复原，而水分子的一OH则又代替Glu270亲核攻击酸酐中间物而形成产物，并使Glu—270复原。

五、乳酸脱氢酶 (Lactate dehydrogenase LDH)

LDH是由两类亚基以不同比例聚合而成的四聚体，由于聚合的比例不同，共有五种同

工酶 H_4 、 H_3M 、 H_2M_2 、 HM_3 、 M_4 。 H_4 是在心肌中占优势的 LDH， M_4 是在骨肌中占优势的 LDH。

通过 x -射线晶体学研究和氨基酸序列测定，发现狗鱼的 M_4 型 LDH 有 40% 的 α -螺旋和 23% 的各种形式的 β -折叠结构，而且还有超二级结构。在分子中 N-端一半有四股平行 β -折叠结构片层，而 C-端一半有两股反平行 β -折叠结构片层。这种片层结构是所有脱氢酶共同的结构，它与 NAD 的结合有关。 β -折叠股之间以 α -螺旋相连。构象图示于图 6—36。

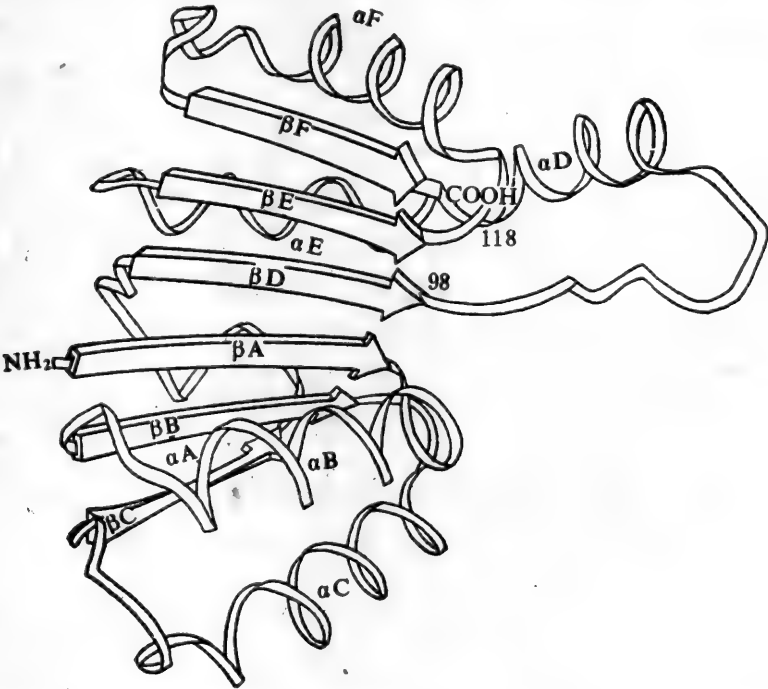


图 6—36 乳酸脱氢酶中六股 β -折叠链构成的片层（以箭头表示）和折叠链的连线 α -螺旋和伸展肽链。 β D 和 β E 股之间为 NAD^+ 结合处， β A 和 β B 之间为腺嘌呤结合处。

关于 NAD^+ 与 LDH 酶蛋白的结合详情已充分研究过。酶蛋白上各氨基酸侧链与 NAD^+ 间的静电键或氢键见图 6—37a。此外腺嘌呤结合部位是酶蛋白分子上的疏水口袋，那是由 Val-27、32、54 和 Ile-96、119、123 以及 Ala-98 等疏水氨基酸的侧链所构成。烟酰胺环结合部位也有各种疏水氨基酸侧链以帮助酶和辅酶底物更适当地结合。

酶活性部位各氨基酸分别有如下功能：Tyr-85 的酚—OH 与 NAD 嘌呤环的 N-1 形成氢键使嘌呤环定向，Asp53—COO⁻ 与腺苷 2'-OH 形成氢键，进一步使嘌呤环定向并显示 LDH 对 NAD^+ 的专一性，而它不能作用于 $NADP^+$ 。Lys250— ϵ —NH₂ 与烟酰胺侧链 $C=O$ 形成氢键，使该环定向，使烟酰胺环的 A-侧露向底物乳酸，负责 LDH 催化 A-侧脱氢专一性。从而与其它脱氢酶如 3-磷酸甘油醛脱氢酶显 B-侧专一性相区别（A-侧和 B-侧氢表示如下）。

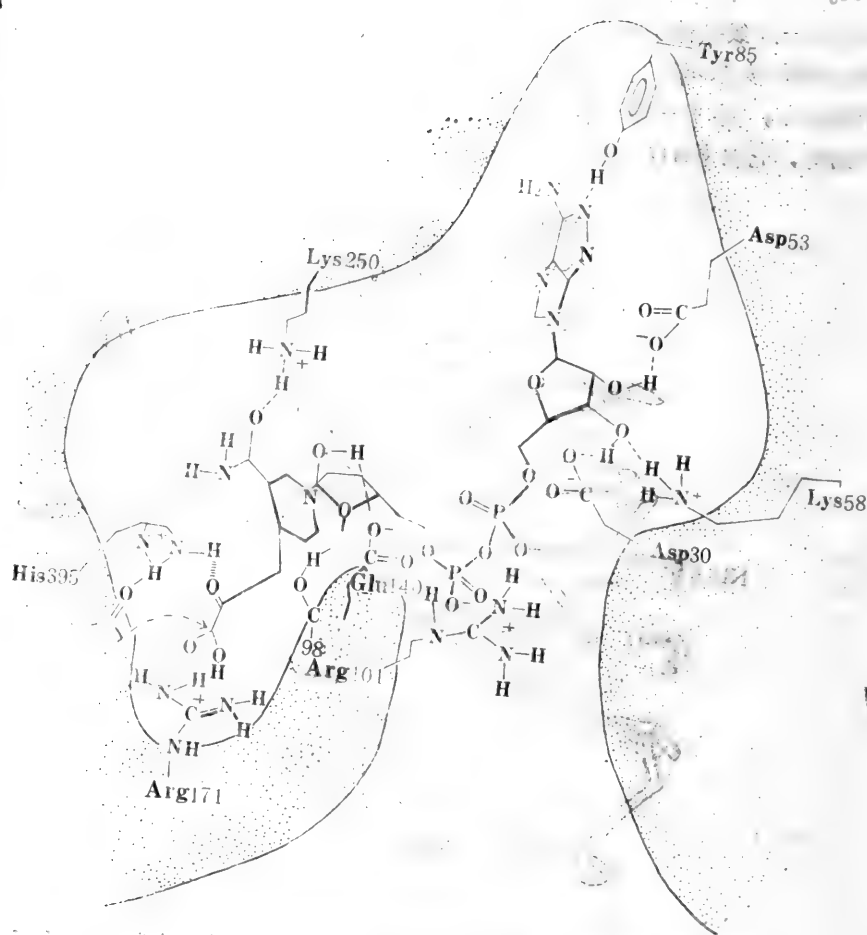
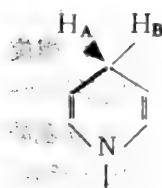


图6—37a 乳酸脱氢酶中各种氨基酸侧链与 NAD⁺ 之间的静电键和氢键。

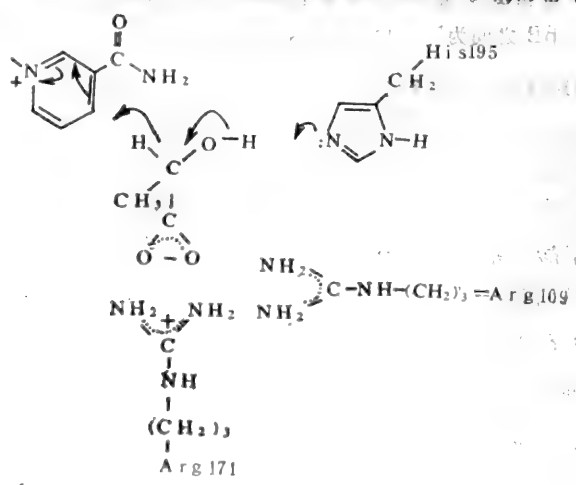


图6—37(b) 乳酸脱氢酶催化过程中 NAD⁺—酶—乳酸间的相互作用

从LDH的抑制剂复合物 NAD —E—丙酮酸、NAD —E—草酸、NAD —E—草酰胺等的 α -射线晶体学研究，提出 NAD —酶—乳酸有如图6—37(b)的相互作用。从该图可以看出，侧链 Arg-109和 Arg-171与乳酸-COO⁻ 形成静电键，侧链 His-195-咪唑基与乳酸醇-OH 形成氢键以起动催化过程中的电子转移反应（图6—37(b)中箭头所示方向）。

酶分子由于底物的诱导契合所产生的构象变化对催化活泼复合物的形成似乎起着决定性作用。例如酶蛋白中有一适应性很强的圈（loop）位于98—120位氨基酸之间（图6—36），它在底物不存在时伸入溶剂中；而在底物—辅酶—酶蛋白三元复合物中它向下移动把底物包围，从而由酶活性部位排除水分子，以造成适于反应的非极性环境；又例如 Arg109和 His195各移近底物1.4nm和0.1—0.2nm，这移动虽小，但就是由于这小小的移动，使 His195与乳酸的醇-OH 接触，起动催化作用中的电子移动反应。

用化学修饰法也证实 His195和 Arg 等在催化作用中起重要作用。

从乳酸脱氢酶的研究结果，结合其它脱氢酶的一些近代成就，发现除醇脱氢酶外，其它脱氢酶都有一个共同的 His—侧链，能从底物的醇-OH 脱去一个质子，起碱催化作用，进而又促进碳原子上的一个质子向烟酰胺环4-位上转移。醇脱氢酶中虽无与此类似的 His，但它特有的一个 Zn²⁺ 位于活性部位，Zn²⁺ 或结合于 Zn²⁺ 上解离的水（Zn²⁺ —OH⁻）起着类似 His 的作用。另外从各种脱氢酶烟酰胺结合部位结构的差异，即能解释它们脱氢的专一性。进一步就这两方面进行更多脱氢酶的研究，将会找出脱氢酶催化底物脱氢的规律。

第八节 具有起搏器(Pacemaker)和调节酶(Regulatory enzyme)性质的酶系统

在细胞代谢中，常有一组酶，按一定次序连接起来完成一定的代谢过程。如骨肌中葡萄糖转变为乳酸，活体从一简单前体合成某氨基酸等过程，都是由按一定次序连接的酶系统所催化的。在这样的酶系统中，第一个酶的反应产物就成为下一个酶的底物，以下照此进行（图6—38）。这种多酶系统有时多达十余个或更多的酶，并按特定次序反应。

在某多酶系统中，至少有一个酶由于它在催化序列中催化最慢的一步反应，故它就成了一个起搏器，以调节整个序列的酶促反应速度。这样的起搏器，不仅有催化某一步反应的功能，还能应答某种信号，从而增强或降低其催化活性。通过这样的起搏作用，就可使各种代谢过程经常得到调整，从而不断改变细胞对能量的需要和细胞生长、修补所需建造分子的数量。在大部分多酶系统中，其序列中第一个酶往往是起搏酶，而其它酶则以大量过量存在，服从起搏酶指令，尽快地催化各自的反应。

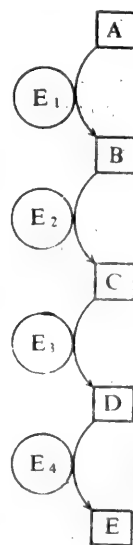


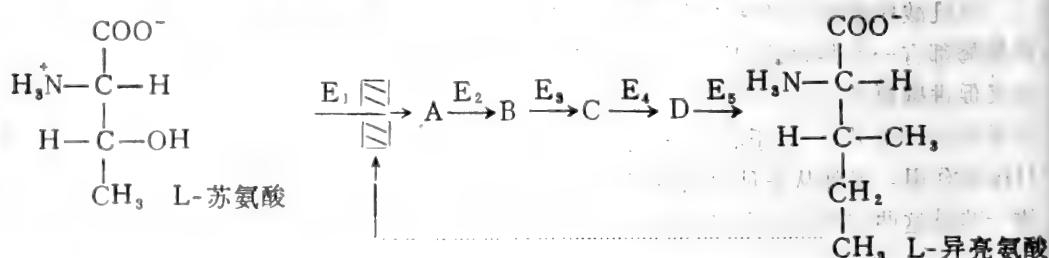
图6—38 经四个酶依次催化使 A 转变为 P 的多酶系统示意图

起酶活性是通过各种类型信号分子来调节的，所以它又称调节酶。有两种类型的调节酶，即别构酶或非共价调节酶和共价调节酶。

一、别构酶 (Allosteric enzyme)

(一) 别构酶的典型实例及其性质

别构酶是通过调节剂分子非共价结合于酶分子上而进行调节的。在一些多酶系统中，调节酶能被一系列酶的终产物所抑制。当一个代谢序列的终产物增加到超过通常的稳态水平时，就超过细胞的需要，这时，为了使这终产物不致继续形成，它就作为一个专一性抑制剂，抑制序列中第一个酶—调节酶，从而使整个代谢序列的反应速度减慢，使该终产物形成的速度降到细胞需要的水平。这一类型的调节，称为反馈调节。催化 L-苏氨酸转变为 L-异亮氨酸的细菌酶系是一个典型实例，可示如下式。式中多酶体系的第一个酶 E_1 为 L-苏氨酸脱水酶，可被该多酶序列中的终产物 L-异亮氨酸反馈抑制（其它四个酶 E_2-E_5 及其催化的反应见第十一章）。这种抑制是专一的而且是可逆的。L-异亮氨酸不能抑制 E_2-E_5 各酶，且当 L-异亮氨酸浓度下降时， E_1 的活性又可恢复。因此 E_1 这个酶能快速而可逆地敏感到细胞内 L-Ile 浓度的波动。虽然 L-Ile 是 E_1 酶非常专一的抑制剂，但它并不结合于酶上的底物结合部位，而是结合于另一个专一性部位，称为调节部位。由于这种结合是非共价的，所以易于逆转。



L-苏氨酸脱水酶是别构酶中的一个典型成员。别构酶这个名词是由希腊字 all “other” 和 stereos “space” 或 “site” 所导出，别构酶即“另外部位的酶”之意。别构酶和简单的非调节酶有以下三点明显区别。

① 别构酶象其它酶一样具有底物结合部位和催化部位，能结合底物并催化其转变。但这类酶还有一个或多个别构部位（或称调节部位）能结合调节剂分子。调节剂分子又称效应剂 (effector)，对酶的调节部位是专一的。图6—39是别构酶的结构及其与底物和效应剂结合的示意图。

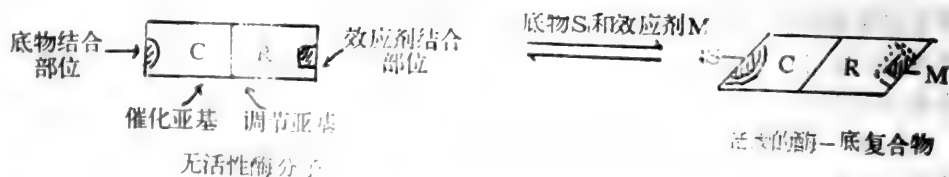


图6—39 别构酶结构及其与底物和效应剂结合示意图

② 别构酶分子比一般非调节酶分子大，而且更复杂，其中大部分由两个或多个亚基构成。

③ 别构酶的 $v \sim [s]$ 曲线与典型的米氏酶的 $v \sim [s]$ 双曲线有偏差(下面再详细介绍)。

(二)别构酶的调节剂

别构酶的别构部位能与专一性的调节剂结合。当细胞中这种调节剂浓度升高时，酶即转变为低活性或无活性形式，暂时失去催化活性。而当调节剂浓度下降时，调节剂又离开酶的别构部位，酶即恢复原有构象和催化活性，这种调节剂称负调节剂或负效应剂。有一些酶能被某调节剂分子所刺激，这种调节剂称正调节剂或正效应剂。正调节剂不是一系列代谢反应的终产物，而是其它一些代谢产物，能作为信号分子提高酶的活性。这种正调节剂往往是底物本身，因此这种别构酶又称为同促别构酶(即底物起了调节剂的作用)。这个酶有两个或更多个底物结合部位，这些底物结合部位可起双重作用，既可起催化部位的作用，又可起调节部位的作用。有些正调节剂不是底物，故这种正调节剂又称别构激活剂。而上述负效应剂就称为别构抑制剂。无论是别构激活剂还是别构抑制剂，都能激活或降低一个酶的活性，这作用称异促作用，具有异促作用的酶称为异促别构酶。

一个别构酶的“开”和“关”，就象2,3-二磷酸甘油酸对血红蛋白结合氧起开关作用一样(第三章)。有些别构酶有两个或多个作用相反的调节剂、一些起刺激作用，而另一些起抑制作用。对更为复杂的别构酶，每个调节剂有其专一性结合部位。当这些部位被占据时，指令酶加速或减慢其催化作用。抑制或刺激的别构调节作用示于下式：

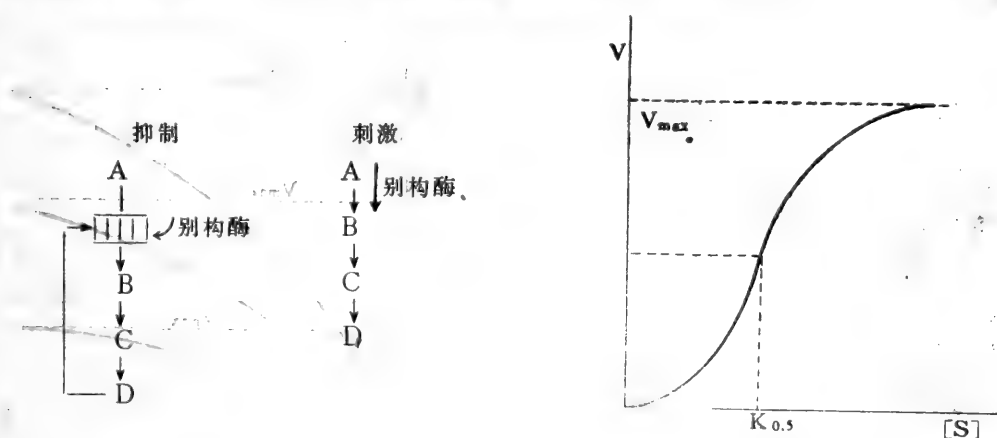


图6-40 别构酶的 $v \sim [s]$ 曲线

(三)别构酶和米氏酶的区别

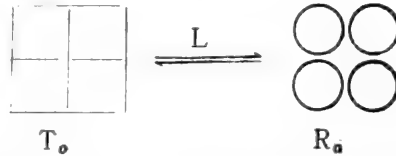
米氏型酶的 $v \sim [s]$ 曲线为双曲线，已如上述。别构酶的 $v \sim [s]$ 曲线常为S形，而不是经典的双曲线。在S形曲线上虽然可能找到最大反应速度一半时的底物浓度，但不能称它为 K_m ，因为别构酶不遵循米氏规则，而一般以 $[s]_{0.5}$ 或 $K_{0.5}$ 表示。

别构酶为什么具有S形 $v \sim [s]$ 曲线呢？一般别构酶有几个亚基，每个亚基有一个底物结合部位，当一个亚基结合底物后，酶的构象将发生改变，增加了后续亚基与底物的亲和力，这样就造成在一定区间稍许增加底物浓度，即可大大加速酶促反应速度，因而得S形 $v \sim [s]$ 曲

线，如图6—40所示。

关于第一个底物分子与酶结合后为什么会增加后续底物分子与酶的亲和力的问题，迄今已有许多模型来加以解释。现介绍一种较为普遍的 M.W.C 模型，并解释如下：

M.W.C. 模型假设酶的各个亚基可以两种构象状态存在，一种称为 T 态，它与底物亲和力很小，另一种为 R 态，它与底物有很强的亲和力。在底物不存在时，T 态和 R 态之间存在平衡，在平衡状态时，酶大部分以 T 态存在，而 R 态很少，即 $T_o \xrightleftharpoons{L} R_o$ 时，L (平衡常数) 很大。以四聚体酶为例可示如下：当酶上结合一个 S 后，由于四个亚基的构象变化是



同步的，所以在 S 的诱导下，四个 T 态亚基都会转变成对底物有高亲和力的 R 态—— $\textcircled{S}\textcircled{S}\textcircled{S}\textcircled{S}$ 。即一个 S 的结合，就会增加三个 R 态亚基，因而使后续底物分子与酶的亲和力大增。这时只要 S 浓度稍有增加，酶促反应速度将因酶 R 态浓度增加了三倍而陡增。但当 S 浓度增至一极限时，因 $T \rightleftharpoons R$ 间的平衡极度偏向 R 方向，所以大部分酶都以 R 态存在，即以 $\textcircled{S}\textcircled{S}\textcircled{S}\textcircled{S}$ 状态存在，即使再继续增加 S，也不会诱导出更多的 R 态了。这就是说酶促反应已达饱

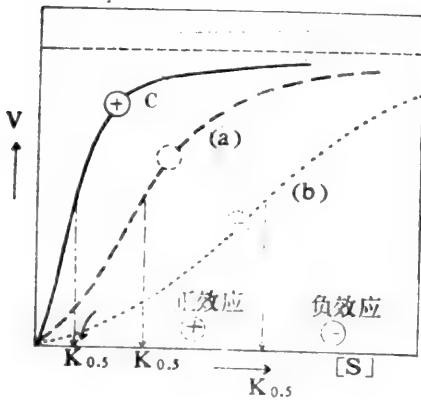


图6—41 别构酶的 $v \sim [S]$ 曲线

- (a) 为一个同促别构酶的 $v \sim [S]$ 曲线，底物作为效应剂， $K_{0.5}$ 为 $\frac{1}{2} V_{max}$ 时的 S 浓度；
- (b) 有底物以外的负效应剂存在下的 $v \sim [S]$ 曲线。 $K_{0.5}$ 变大， V_{max} 不变；
- (c) 有底物以外的正效应剂存在下的 $v \sim [S]$ 曲线。 $K_{0.5}$ 变小， V_{max} 不变。

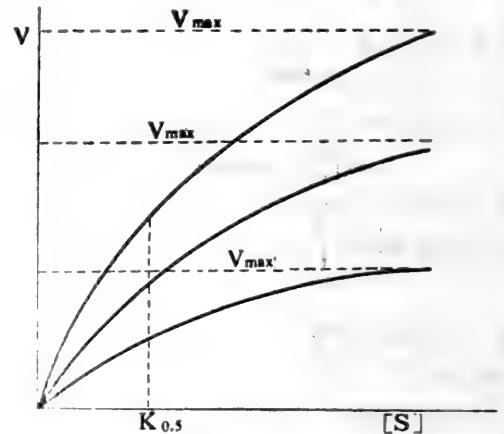


图6—42 一种不太普遍的别构调节作用类型

$K_{0.5}$ 近乎常数，而 V_{max} 则随调节剂的变化而改变。

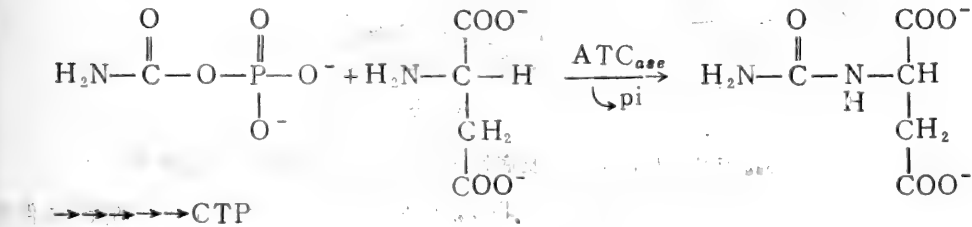
和，反应速度达 V_{max} 。其它还有一些模型用来解释 S 形 $v \sim [s]$ 曲线，不拟一一作介绍。

异促效应剂是底物以外的一些代谢物。负效应剂即别构抑制剂使 $v \sim [s]$ 曲线变得更趋 S 形， $K_{0.5}$ 增加， V_{max} 则难以到达（图6—41曲线(b)）。而别构激活剂则相反，它使 $v \sim [s]$ 曲线更趋双曲线（图6—41的曲线(c)）， $K_{0.5}$ 变小，而 V_{max} 不变。但也有一种别构激活剂使 V_{max} 增加，而 $K_{0.5}$ 变化很小（图6—42）。

(四)别构酶亚基之间的通讯联系 (communication)

别构酶一般由2、4、6、8个或更多的亚基构成。一个亚基结合底物或其它效应剂后，不仅它本身的构象发生改变，而且可通过四级结构影响到其它亚基，使其它亚基产生构象变化，上述 M.W.C. 模型中的 T 态向 R 态的转变就是这种构象改变引起的，这种一个亚基的构象改变而诱导出其它亚基构象改变的一类现象就象亚基之间有通讯联系一样。由于这种联系是一个亚基结合一个底物或其它效应剂后，就可指令其它亚基增加或降低对底物的亲和力，这种效应称为酶催化部位之间所显示的协同效应 (Cooperativity)。凡酶结合第一个底物或效应剂分子后，能增强第二个以及其它后续底物对酶的结合，从而发生激活的作用，就称为正协同作用 (Positive Cooperativity)。反之结合第一个底物或效应剂分子后，降低后续底物分子对酶的结合，呈抑制作用，就称为负协同作用 (negative cooperativity)。

门冬氨酸氨甲酰转移酶 (ATC_{ase}) 是已知比较复杂的别构酶，它催化生物合成 CTP 的六个化学步骤中的第一步反应，即：



CTP 是该酶的一个负调节剂。当 CTP 供给提高时，由于它对 ATC_{ase} 的负调节作用，氨甲酰门冬氨酸的形成受到抑制。相反，当 CTP 浓度很低时，氨甲酰门冬氨酸的形成速度可迅速加快，从而增加 CTP 的合成。ATP 是 ATC_{ase} 的正效应剂，在高浓度 ATP 存在时，则刺激 ATC_{ase} 的催化活性。由此可见 CTP 的作用可作为一个例子，说明它作为一个包含几个连续反应的代谢途径的终产物可暂时减慢其本身的合成。从 ATC_{ase} 也说明：另有一种化合物 ATP，在某些代谢过程中也可与 CTP 一起影响 CTP 的合成。这是在酶水平上代谢调节的一种类型。

ATC_{ase} 的分子量为300,000，用对氯汞苯甲酸等汞化合物，可使其—S—S—键解离成两种类型的亚基。一类亚基称 C₃，具有催化活性而对 CTP 不敏感，它是一个三聚体，M.W 为99,000。每分子天然 ATC_{ase} 有两个 C₃ 催化亚基。三聚体中每个单体都能结合门冬氨酸的类似物琥珀酸，即每分子天然酶能结合六个琥珀酸。另一类亚基 R₂ 是二聚体，为调节亚基 (M.W 为33,000)，每个天然 ATC_{ase} 有三个 R₂ 调节亚基，它结合 CTP，但不与底物结合。每分子天然酶能结合六个 CTP。要重新形成天然酶，需要除去汞化物，并存在两类亚基。天然酶分子中存在六个 Zn²⁺，它是利用游离亚基重建天然酶时不可缺少的成分。

强变性剂可使活性的 C_3 和 R 解离成无活性的单体 C ($M.W = 33,000$) 和 R ($M.W = 17,000$)。以上事实示于图6—43。

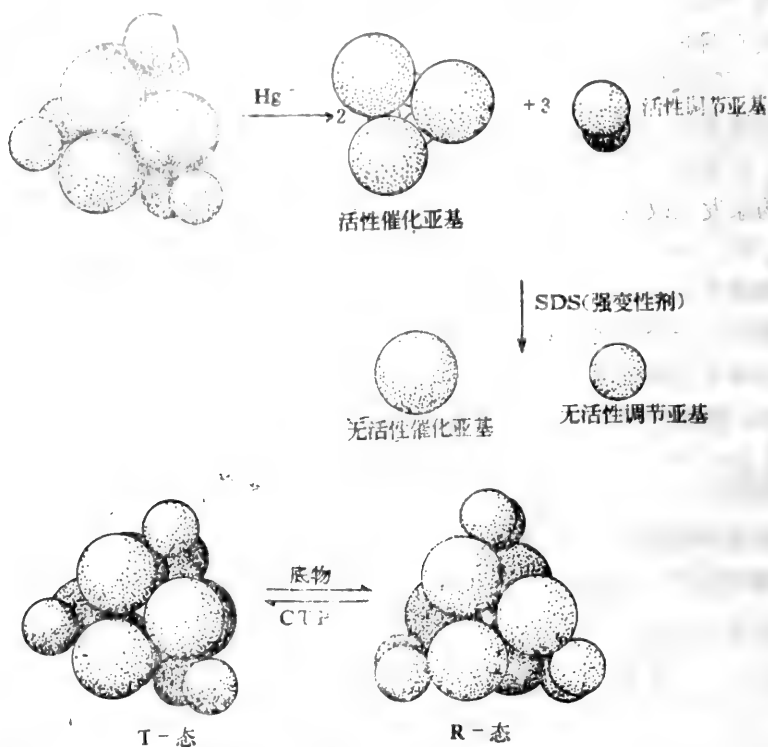


图6—43 ATC_{ase} 亚基结构，解聚以及底物和 CTP 存在下的构象示意图

当用汞化物处理 ATC_{ase} 而使之解离时， ATC_{ase} 的催化活性增强约 4 倍。在此条件下 $v \sim [S]$ 曲线显双曲线类型 (见图6—44A)。而天然酶的 $v \sim [S]$ 曲线则为 S 型向左移动 (图6—44B)。在 CTP 存在下，曲线在横轴上更向右移 (图6—44C)。如以 ATP 来代替 CTP，

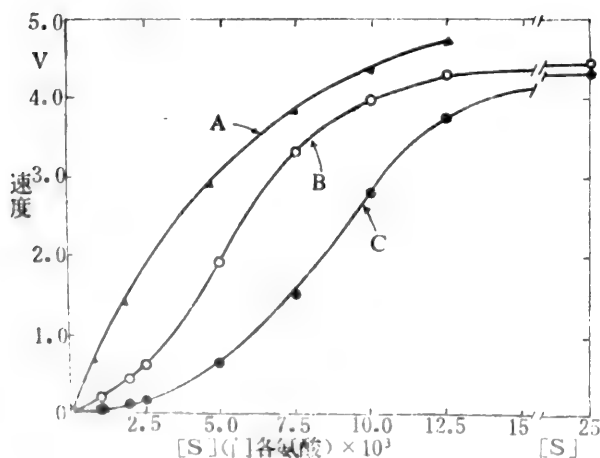


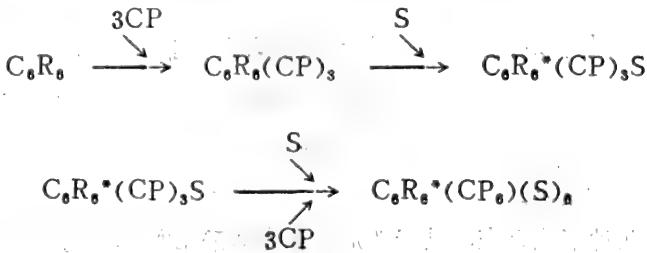
图6—44 ATC_{ase} 的 $v \sim [S]$ 曲线

- A. 解离的 C_3 的曲线;
- B. 天然 ATC_{ase} 的曲线;
- C. 有 CTP 存在下 ATC_{ase} 的曲线。

则曲线亦向左移。因此 ATP 和 CTP 竞争酶上相同的调节部位。

有证据表明 ATC_{ase} 有两种构象形式。在底物存在下它以松弛状态即 R 态存在，而当 CTP 存在下则以紧密状态或 T 态存在。酶中 32 个—S—S—基，在氨甲酰磷酸和底物类似物琥珀酸同时存在下比它们不存在或只有一个底物存在时能更快地与汞化合物反应。CTP 则降低汞与—S—S—基的反应速度。这就是说在 R 态，酶具有松弛构象，它使—S—S—基变得更敏感。此外，当氨甲酰磷酸和琥珀酸存在时测得酶的沉降系数比 CTP 存在时降低了 4%。由于在这些条件下酶不会解离，沉降系数值之所以有差异，可认为是由于 R 态更不对称，具有一增大的摩擦系数造成的。

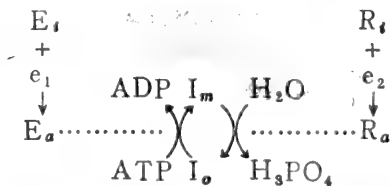
在琥珀酸不存在时，天然 ATC_{ase} 只能结合三分子氨甲酰磷酸 (CP)，但当琥珀酸存在时，则可结合六分子氨甲酰磷酸。这可认为 ATC_{ase} 有同促正协同效应 (如下式)。下式中 C_6R_6 代表天然酶中的六个催化亚基和六个调节亚基，S 代琥珀酸， $C_6R_6^*$ 代表酶的松弛态。从上式可知 CP 的结合没有协同性。一旦琥珀酸结合到 ATC_{ase} 上以后，就会使酶上的 CP 结合部位都结合上 CP，而且琥珀酸也全部协同地结合上去。



二、级联系统共价修饰调节酶

酶活性的调节也可通过共价修饰和非共价修饰酶之间的循环互变而达到。修饰或脱修饰可通过转变酶 (converter enzyme) 而实现，它们与修饰酶、非修饰酶以及它们的效应剂一起形成一个级联系统。共价修饰酶可比非修饰酶更活泼或不活泼，或者两种形式对效应剂可能有不同反映。

最简单的级联系统为单环系统，其运转如下式。



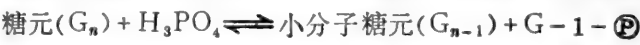
这是一个通过磷酸化而共价修饰的一类酶形式。一个无活性的转变酶 E_i 被专一性别构效应剂 e_1 活化成有活性的转变酶 E_a ，从而启动级联反应。 E_a 在 ATP 参与下，旋即使非修饰酶 I_o 磷酸化，生成修饰酶 I_m 。这一过程是可逆的，它在第二种转变酶 R_a 的催化下， I_m 又可水解脱去一个磷酸而重新生成 I_o 。这个转变酶 R_a 是由无活性的 R_i 经第二种别构效应剂 e_2 作用后活化而成的。不同的单环级联可偶联成二、三或多环级联系统，从而使它对效应剂

浓度更为敏感，使连锁的代谢途径中的底物和产物的回流迅速得到调节。大部分代谢途径的级联调节功能是保持 I_o 和 I_m 两种互变酶形式的稳态浓度，以保证整个代谢中各代谢物的回流。

级联系统调节反应速度的方式有：①级联反应可增强信号，只要利用极少量的转变酶 (E_o 或 R_o) 即可导致大量修饰酶 (I_m) 或非修饰酶 (I_o) 间的互变；②级联反应利用饱和 e^1 使 I_m 的敏感性调整到最大幅度；③级联反应能通过改变效应剂浓度来调整修饰作用的灵敏度；④级联反应作为一个集中系统能灵敏地感知细胞中代谢物浓度在分钟范围内的变化，从而按需要来调整 I_o 和 I_m 的浓度；⑤级联反应又是一个柔性系统，能对别构刺激显示不同应答；⑥级联反应还是速度的放大器，能反映细胞内代谢物浓度在毫秒内的变化。

一些磷酸化酶中的 Ser—OH、Thr—OH 和 Tyr—OH 参与许多级联反应。已知有20余种不同的酶，能进行上述类似的可逆磷酸化反应。这些系统都是利用 ATP 提供能量以保持适量的互变酶来调节反应速度。糖元的合成和降解，胆固醇的生物合成以及氨基酸间的相互转变等过程都是按这种方式来调节的。兹以磷酸化酶催化糖元的合成和降解为例，进行深入说明。

糖元磷酸化酶是肌肉和肝脏中的一种级联调节酶。它所催化的反应如下式：



式中的 G-1-P 在肌肉中可继续转变为乳酸，为肌肉提供能量。它在肝脏中则可降解为葡萄糖，以维持血糖水平。

糖元磷酸化酶可以两种形式存在，其活性形式称为磷酸化酶 a，而非活性形式称为磷酸化酶 b。它们都是二聚体，它们之间的转变是靠两种转变酶来完成的。可示于图6—45。从图中可

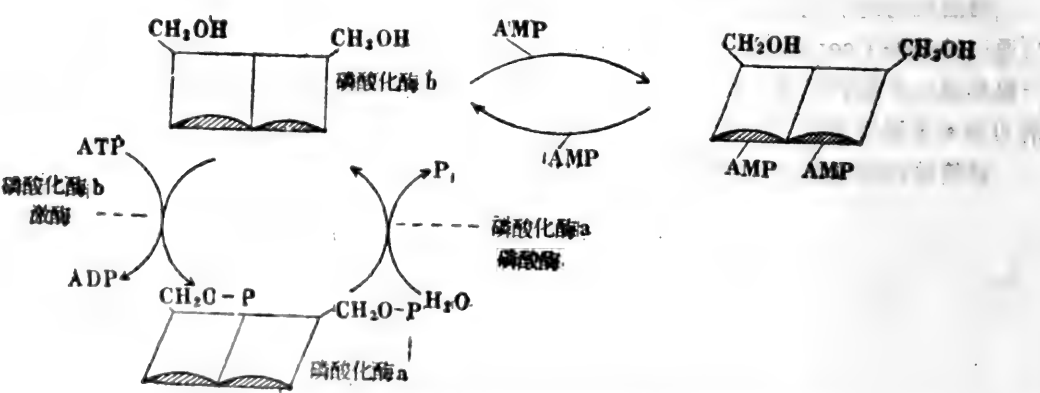


图 6—45 糖元磷酸化酶的存在形式及其级联反应示意图

以看出，肌肉和肝脏中糖元的降解是通过磷酸化酶活性形式和非活性形式比例的变化来调节的。这两种酶形式中 a 形式为 b 形式磷酸化共价修饰而成，两者在四级结构上有区别，因而活性部位结构亦有不同，所以催化活性也不同。

另外，磷酸化酶也可通过非共价结合一些效应剂分子而调节。如磷酸化酶 b 虽无催化活

性,但当其别构正效应剂—AMP与之非共价结合后,即被刺激而活化(图6—45)但这种刺激又可被ATP所抑制,因ATP是负效应剂。因此磷酸化酶的活性又与AMP与ATP的比例有关。

除了象糖元磷酸化酶那样通过磷酸化形式共价修饰来调节酶的活性外,其它类型的共价调节也常发生,如通过专一性氨基酸的甲基化或腺苷酰化而进行调节。如大肠杆菌谷酰胺合成酶是一个已知很复杂的调节酶,它有许多别构调节剂,可以进行反馈调节。Gln是许多产物的前体,如Trp、His、氨甲酰磷酸、葡萄糖胺-6-磷酸、CTP、AMP等都需以它为前体,这些终产物又都能反馈抑制Gln的合成。该酶也能被调节剂ATP所抑制,其作用是从ATP转移一个腺苷酰基于酶亚基中一个酪氨酸—OH上形成低活性形式的酶。

第九节 酶的提取和分离纯化

天然状态的酶大多以复杂的混合物形式存在。在细胞中常含有百种以上不同的酶。要了解任何一种酶的性质、催化特点、结构及作用机制等,首先必须对酶进行分离纯化。

即使很简单的一个代谢过程,也常常是由一系列酶促反应步骤所构成的,对它们反复研究仍难以阐明的代谢路线,一旦把相关的酶分离出来,则其机制自可弄清,这种例子是屡见不鲜的。

酶的分离纯化,不仅是研究酶本身所必需,也常是研究活细胞中的代谢机制所必需的步骤。但必需注意,酶在实验中的环境,务使它尽可能地与活细胞中天然的环境一致。

有目的地对酶进行纯化的工作,始于1922年。1926年Summer获得了第一个酶晶体——结晶状尿酶。从此,被纯化的酶日渐增多,近年来每年几乎都有几十种纯酶问世。

一、酶的提取

提取粗酶的方法因材料不同而异。动物细胞中的酶较易提取,例如在等渗介质中匀浆,即可破坏质膜,用几倍体积的缓冲溶液即可提取细胞质中的可溶性酶,而大部分细胞器则保持不变。如用冰冻和解冻,或超声处理等方法,则细胞质膜和细胞器膜都可被破坏,此法可提取获得细胞中所有可溶性酶。

从植物组织中提取可溶性酶,亦因材料而异。如谷粒只要简单地放入水或缓冲液中搅拌,土豆等软贮藏器官则可磨碎、挤汁、过滤;植物叶和干燥种子则在研磨器中研磨,再在匀浆器中用适当介质匀浆,也可在几倍体积的冷丙酮中研磨制成丙酮粉,再用适当介质提取。

从微生物中提取酶的方法与从植物中的类似,只因为其细胞壁更易破坏,故常把机械破碎及超声处理等方法结合使用。近年来还加溶菌酶或葡萄糖醛酸酶等以帮助细胞壁破碎。

一些膜结合酶不能简单地用上述方法提取。视酶结合的状态不同,可用丙酮干燥;丁醇——水混合物处理;几种有机溶剂提取;加胆酸盐或Tween类非离子型去污剂;有机非离子型表面活性剂等的水溶液提取。还可加过氧酸等促溶剂,以加速提取。

二、粗提液中各种酶成分的分离

粗酶提取液成分还相当复杂，要获得所希望的某种酶大致有以下一些方法。

①根据酶的等电点不同，通过调节介质的 pH 值，使某酶与其它杂蛋白分开。

②通过热变性原理分离各种酶。各种蛋白质热变性温度不同。对一个热稳定酶常可利用这一特性控制一定温度选择性地除去大量不需要的杂蛋白。有时还可附加某酶的底物，使所希望的酶的热变性温度提高，以除去更多杂蛋白。

③有机溶剂分步沉淀法。常用的有机溶剂有乙醇和丙酮。由于有机溶剂能使酶变性，采用此法时必须保持低温和一定 pH 及离子强度。

④分步盐析法。这是常用于酶分离的一种有效方法。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶性大，对大部分酶非但没有损害，实际上还有稳定作用，它用于酶的分离 优于其它盐类。分离某酶所需 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度，可根据预试获得。用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 进行分步盐析可加 固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 或不同饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液。图6—46是可供查找的达到一定 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和度所需 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的量。例如从图中A 线可知：如果酶溶液原始的盐饱和度为0.25，要达到0.8饱和度，则必须在1升原始溶液中加入386克固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ；从 A 和 B 线可知：要使500ml

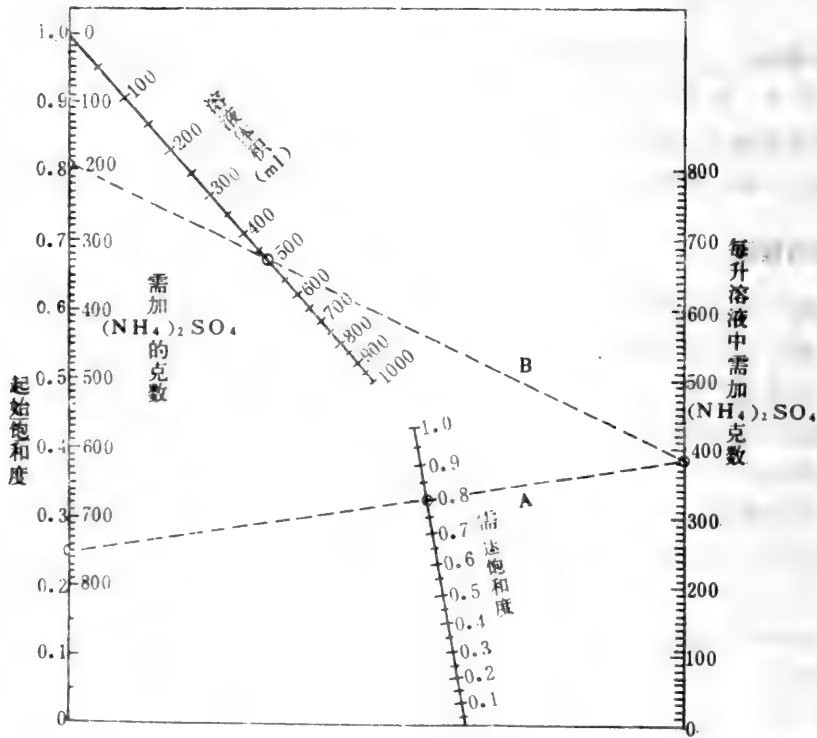


图6—46 加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_2$ 量的设计图

饱和度为0.25的原始酶溶液达到0.8的饱和度，则需加193克 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。

用盐析法分离酶，酶沉淀的准确盐浓度不仅决定于 pH、温度、盐的本性，也决定于酶

本身的浓度。

三、酶的进一步纯化

上述部分纯化的酶，可用不同方法进一步纯化。

(一)柱层析法

近年来用柱层析纯化酶，已成为常规而有效的方法。其分离纯化机制随所用柱材料的种类而异。其中有吸附、离子交换、分子筛以及对不同配体的特殊亲和力等各种不同机制。分离机制虽各异，但操作过程实际上很相似。大部分是把酶制剂溶液慢慢加到预先用一定 pH 缓冲液平衡好的柱上，然后用缓冲液淋洗以除去杂蛋白，再用梯度盐溶液或某酶的专一性配体溶液洗脱，并部分收集各组分，合并各活性组分，浓缩或结晶，贮存备用。

吸附柱层析常用的材料有羟基磷灰石，这是特制的磷酸钙小晶体。当酶或蛋白质用稀中性磷酸缓冲液上柱时，许多酶或蛋白质会吸附于基质表面。然后以增加浓度的线性梯度缓冲液洗脱，即可在某一梯度区间获得所需酶的洗脱液。

在酶层析中最常用的离子交换材料有羧甲基纤维素（带 $\text{—O—CH}_2\text{COO}^-$ 基团）CM、

磺化乙基纤维素（带 $\text{—O—CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ ）Se、磷酸纤维素（带 —O—P(=O)(OH)—O^- ）PC 等阳离子

交换剂，它们的负离子基团的 pK_a 值在 1—7 范围内。另外还有 DEAE—纤维素

（带 $\text{—O—CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{(C}_2\text{H}_5)_2$ ）、TEAE—纤维素（带 $\text{—O—CH}_2\text{CH}_2\text{N(C}_2\text{H}_5)_3$ ）和 ECTE—

OLA—纤维素（是三乙醇胺经甘油和多聚甘油链偶联于纤维素而成）等阴离子交换剂，其正离子基团的 pK_a 范围为 7—10。

在用阳离子交换柱时，常用强吸附条件如 pH5 和 10mM 阳离子缓冲液使酶上柱，然后用逐渐增加离子强度或 pH 的梯度缓冲液洗脱，一定的酶可在一定梯度区间由柱释放而洗脱。用阴离子交换柱时，其强吸附条件常用 pH8 和 10mM 阴离子缓冲液上柱，最后用降低 pH 或增高阴离子的梯度缓冲液洗脱，即获得所需的酶。

亲和层析是把一个配体（某酶的底物、底物类似物、抑制剂或其它效应剂）固定于一不溶性支持物上。这样的物质作为柱层析材料就可从流过的溶液中选择性地吸附某种酶，然后再用梯度盐浓度，或酶的底物或抑制剂溶液将所需酶洗脱。琼脂糖是最常用的支持物，例如在制备胰蛋白酶时，常用卵粘蛋白固定于琼脂糖（Sephrose）上制成亲和层析柱；纯化限制性内切酶时常用 DNA 或肝素等固定在琼脂糖上制成亲和层析柱。在低盐浓度下把酶溶液上柱，然后用高浓度梯度盐溶液洗脱，酶即可在某一梯度盐浓度范围内从柱上解离下来。又例如纯化乳酸脱氢酶时，可用草酸盐（底物丙酮酸类似物）固定于琼脂糖上制成亲和层析柱，酶溶液流经该柱时即被吸附，然后用 NADH（辅酶或载体底物）将乳酸脱氢酶洗脱。

凝胶过滤又称分子筛层析，此法是按酶分子量不同把需要的酶分离纯化出来。交链葡聚糖或珠状琼脂糖凝胶等是常用的层析材料。此法中分子量大的组分不易进入凝胶颗粒的小孔中而很快从颗粒的间隙中流出。而分子量小的组分，进入颗粒孔中的较多，则流出很慢。一

定分子量的酶，会在一定分部溶液中排出。

(二) 电泳法

一种蛋白质在电场中有其特有的迁移率，利用这一原理可以分离纯化某种酶。但这种方法目前主要用于酶的快速分析鉴定，难以获得大量酶制品。但近年来已设计出能用于连续定量地回收酶的电泳设施。另外，淀粉凝胶板电泳。聚丙烯酰胺凝胶板电泳亦可用来分离纯化而得到小量酶制品。

除了层析及电泳外，超离心技术亦常用于酶的分离纯化。

四、酶的结晶和浓缩

当一个酶已达高度纯化状态时，就有可能使之结晶。但结晶并非纯酶标准。首次结晶的酶可能还含有许多杂质，经重结晶甚至要多次重结晶，酶的比活达到恒定，才算得到了一个纯酶结晶，才可用其于酶的构象研究。

最常用的酶结晶方法是在 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液中结晶。一般是向酶溶液中慢慢加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，直至微混浊出现。放置让其结晶即可。也可在恒浓度的硫酸铵中通过改变 pH 或温度使之结晶。

难以结晶的酶需进一步浓缩，方可获得结晶。最好的浓缩方法一是超滤法，二是将酶液对非渗透性的集水大分子（如聚乙二醇或葡聚糖等）透析法。前者是把酶溶液注入有一定孔隙度超滤膜的器皿中，让酶保留于膜上，而小分子杂质则透过膜流出。如果酶蛋白分子量不大，则可先用孔隙度高的膜，使酶穿过膜流出，再用低孔隙度膜，使酶留在膜上。而其它小分子物质则被滤出。超滤不仅能使酶浓缩，连续使用不同孔径的超滤膜，也可用于酶的纯化。

五、酶的纯度鉴定及其指标

一个酶是否已纯化到均一程度，没有任何简单方法可以证明，必须用许多实验同时验证，才能得出可靠结论。

分析超离心法是常用的鉴定酶纯度的方法之一，但它只能观察到一个单一界面，并不能作为酶均一性的表征。因为许多蛋白质的沉降常数非常接近或完全相同。具有相同沉降速度的两种或多种酶蛋白的混合物完全可能只有一个单一界面。尤其是一个不对称的单峰，常表明有杂质存在。但利用密度梯度离心，然后通过抽样测定不同密度区的蛋白质浓度和酶活性，如果单一对称带整个都具有常数比活，则这个单峰可作为酶的纯净标志。

用凝胶层析分离酶时，如果被洗脱峰具有常数比活，也常作为酶纯净的标志。但相同分子量的两个酶，不能用此法辨认。

电泳法比超离心法和凝胶层析法能分辨更多的酶组分。特别是区带电泳是最常用的检验酶均一性的技术。酶蛋白分子间只要有几个电荷差异，都可成功地分离成不同的区带。区带电泳完成后，把支持物分为相同的两半，一半染色以指示蛋白质的存在，而另一半测酶活，如果蛋白带与酶活带刚好重合，则基本可确定酶已达均一。

等电聚焦测试酶均一性最灵敏的方法。同时它完全可以证明单一酶可以多种形式存在。已用其它方法证明是均一的酶，用等电聚焦时常可分离成几个组分。

第十节 具有催化活性的多核苷酸

生物体内一切化学反应都是在酶的催化下进行的，酶是一种有催化活性的蛋白质，这也是多少年来公认的事实。但1982年 T. R. Cech 发现原生动物四膜虫（*Tetrahymena*）的 rRNA 前体编码基因中插入序列（IVS）的剪接，无需任何含蛋白质的酶类参与，它可自动完成。这一发现说明 RNA 具有与酶相似的催化活性。

他们发现四膜虫嗜热菌大 rRNA 前体有一413b. p 的插入序列（又称内含子），该 rRNA 经纯化去蛋白后，在 $MgCl_2$ 存在下与 GTP（GDP、GMP或鸟苷）一起保温就会进行剪接反应。其剪接过程首先是鸟苷辅助因子向 rRNA 上 IVS 5'-端磷原子进行亲核攻击，IVS 5'-端的 U_pA_p 序列准确切开，而 G 则代替 U 结合于 A 的 5'-端。第二步是自由外显子 3'-U 亲核进攻413内含子的另一端，准确切开 IVS 3'-端一个 G_pU 磷酸二酯键，使两段外显子接在一起而内含子被挤出。被挤出的游离内含子再进行一系列的级联的自发反应。其过程是 IVS 的 3'-G 专一性地攻击5'-端第15和16两个核苷酸间的磷酸二酯键，准确地切下一个十五聚核苷

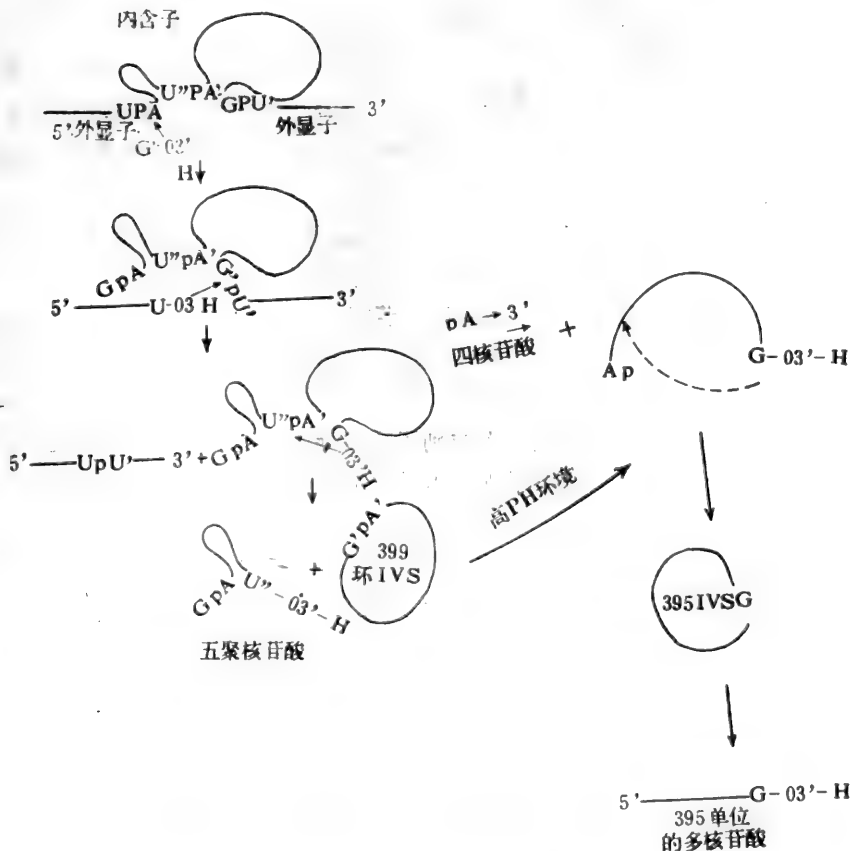


图6-17 大应剪核 rRNA（四膜虫）的剪接反应

酸，剩余部分环化成 399 个核苷酸的环状多核苷酸。这个环状多核苷酸，若暴露于较高 pH 环境中，环叉打开，打开位置恰好在先前环化的位置。具有活性的 3'-端 G—OH^{3'}，又开始向 5'-端进攻，准确地切下一个四核苷酸和一个新的含 395 个核苷酸的环状多核苷酸。在弱碱中它又打开成为长 395 个单位的多核苷酸，至此级联反应告终。这个 395 个单位的多核苷酸 IVS 具有酶活性。所以称为 Ribozyme。整个催化剪接过程如图 6—47。

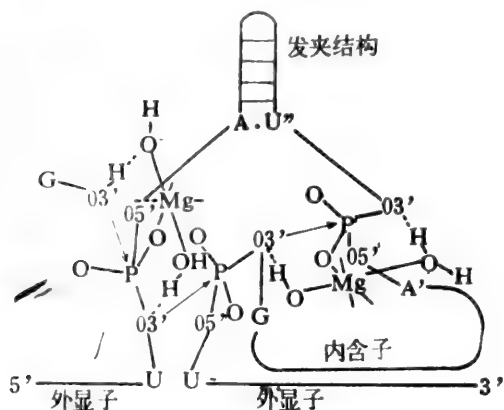


图 6—48 Ribozyme 反应的骨架模型

后来经研究分析认为这个 RNA 自催化的剪接反应，很象 RNaseA 催化 RNA 的水解反应。 Mg^{2+} 的作用是它与被切磷酸二酯键的 P—O 键上的 O 配位结合，同时 Mg^{2+} 又与 H_2O 形成一个复杂的配位体，使配位体上的 H_2O 在磷酸二酯键断裂中起质子供体和受体作用，它类似于 RNaseA 中的两个组氨酸。根据反应机制导出的 Ribozyme 反应模型如图 6—48。

关于 Ribozyme 催化反应中的识别机制问题。经研究发现 ATP、UTP、CTP 以及它们的一磷酸、二磷酸化合物和 2'、3' 无一—OH 的 GTP 等均不能代替鸟苷因子起辅助作用。

故推测鸟苷的识别作用只有靠其 2-位— NH_2 与 $U—O—2$ 形成氢键以及它的 $O—2'H$ 与 Mg^{2+} 配位的水分子形成氢键，这方面的研究正在进行中。

Altman 研究小组在研究 RNase—P 特异裂解埃氏大肠杆菌的核苷酸生成 tRNA 时，发现裂解生成的 RNA 在 5'-端留下磷酸，3'-端则无磷酸（见第十三章 RNA 合成一节），而且他们还证明 RNase—P 含 RNA 和蛋白质，若将二者拆开，则各自都失去活性，重组后活性又恢复。当留一点蛋白于 RNA 中时，酶活性被促进。这也证明 RNA 在 RNase—P 酶中对核苷酸的切割起一定催化作用。

Cech 和 Altman 之后还有一些学者找到了更多能自我剪接的 RNA，反应机制和 Cech 的相似，这些酶也都含有 RNA 和蛋白质。RNA 是否有催化功能，如何催化 RNA 的剪接还在研究之中。

关于多聚核苷酸是否真正具有酶的催化活性？催化需要什么条件？这些与其一定的空间构象有无关系？有何关系等问题，正在积极的研究之中。

第七章 激 素

第一节 激素概述

一、激素的概念

激素 (Hormone) 一词源于希腊文 Horman, 系激动或刺激之意。1904年, Bayliss 和 Starling 首先将该词用来描述胰泌素 (Secretin) 的生理功能。当时, 他们把激素定义为一种化学递质 (Chemical transmitter), 由一种器官产生和释放, 然后通过血液运送到靶器官, 并在那里刺激产生特定的生理效应。这个经典的定义对大多数激素仍然适用, 但不是对所有的激素严格适用。因为并不是所有的激素都具有刺激作用, 有些则有抑制作用。生长激素抑制素是一种激素, 它能抑制几种激素的分泌。有些激素例如肾上腺素对某一种生化反应有刺激作用, 而对另一种反应却有抑制作用。此外, 有些激素仅在分泌细胞的附近发挥它们的生理效应, 只需扩散而不必通过血液运送即可达到靶细胞。还有某些激素例如前列腺素亦与大多数激素不同, 几乎能在所有组织细胞中产生。

由于最初定义的局限性, 所以现在一般认为激素是由机体内一部分细胞产生和释放、通过扩散或血液运送到另一部分细胞, 并在那里起调节代谢活动作用的一类微量的化学信息分子。

激素的概念今天已经不只是适用于动物, 因为植物体内也能合成和释放激素, 而且过去一向认为只有动物特有的一些激素如甾醇类激素在植物中也有发现。

本章主要讨论一些高等动物激素和它们的作用。

二、激素的功能

生物体内的化学反应是相当复杂的。一个单一的细胞, 无论是原核的或者是真核的, 都需要复杂的调节系统对细胞内的各种反应进行控制, 使其达到胞内的稳衡 (Homeostasis)。高等生物, 特别是高等动物, 其个体由亿万个以上的细胞构成, 机体的各部分分别执行不同的生理功能。但是, 是什么因素使这些不同的组织、器官或细胞一方面有所分工执行不同的生化反应, 表现出不同的生理功能, 另一方面又相互合作而成为一个有机的整体呢? 大量的实验证明, 激素在机体中起着协调整合的作用。动物的代谢、生长、发育、生殖或行为, 植物的发芽、生根、开花等生理现象都受到激素的调节和控制。

激素主要通过三种方式来发挥其特定的作用: ①影响酶和蛋白质的合成; ②影响酶活性和酶促反应的速度; ③改变细胞膜的通透性。

三、激素的分类

根据来源可将激素分为动物激素和植物激素。根据动物激素组织器官来源的不同, 可将

其分为腺体激素和组织激素。腺体激素系由各种内分泌腺（如脑垂体、甲状腺、甲状旁腺、肾上腺、胰腺和性腺等）分泌；组织激素则由具有内分泌功能的一些组织（如胃幽门部、十二指肠粘膜和丘脑下部某些神经细胞）所分泌。根据动物激素在化学上的多样性，可将其分为四类，即蛋白质和多肽激素、氨基酸衍生物激素、甾醇类激素，以及脂肪酸衍生物激素。

1. 蛋白质和多肽激素

蛋白质和多肽激素系由氨基酸借肽键连接而构成。这类激素的种类很多，其分子结构变化很大。一般认为分子量超过 5,000 道尔顿的多肽激素应属于蛋白质激素，例如胰岛素、生长激素等。分子量低于 5,000 道尔顿的则应属于多肽激素，例如催产素、加压素、胰高血糖素等。

蛋白质和多肽激素的生物合成途径与一般蛋白质的合成相同，是编码这类激素的结构基因的表达产物。但是，某些分子很小的肽激素并不一定是基因表达的产物，例如促甲状腺激素释放激素是由三个氨基酸残基构成的三肽，该激素可能是通过丘脑下部的酶促合成的。

2. 氨基酸衍生物激素

氨基酸衍生物激素分别是由两种氨基酸，即酪氨酸和色氨酸经酶促衍生而成。酪氨酸通过酶促转变生成肾上腺髓质激素和甲状腺激素；色氨酸则可以酶促生成褪黑激素和 5-羟色胺。

3. 甾醇类激素

甾醇类激素的化学本质是环戊烷多氢菲的衍生物。肾上腺皮质和性腺分泌的激素属于此类。这类激素的合成与蛋白质和肽类激素的合成不一样，它们是通过机体内已存在的酶或酶系催化合成的，其中有的是某种激素的代谢物，例如雄烯二酮和雄酮是睾酮的代谢产物。

4. 脂肪酸衍生物激素

脂肪酸衍生物激素是指前列腺素。前列腺素是一类具有激素活性的物质的总称，其化学本质是廿碳不饱和脂酸的衍生物，通过酶促转化而成。

四、激素分泌的控制

内分泌系统各成员之间并不是彼此独立的，而是相互联系并受到不同层次的调节控制。各种内分泌腺和靶组织之间的调节关系如图7—1所示。

下丘脑是大脑的一特化部分，是内分泌系统的调节中心。下丘脑接受和调整来自中枢神经系统(Central nervous system)的信息。下丘脑接受这些信息后，便产生一些下丘脑调节激素，然后这些激素通过丘脑静脉血液系统运送到垂体前叶(Anterior pituitary)。每一种下丘脑激素都能调节垂体前叶分泌一种特定的激素。某些下丘脑激素促进垂体前叶分泌促激素(Trophichormone)，而另一些下丘脑激素则有相反的作用，表现出抑制作用。一旦垂体受到刺激，它就分泌激素，然后激素通过血液运送到下一级内分泌腺。这一级分泌腺包括肾上腺皮质、胰腺的分泌细胞、甲状腺，以及卵巢和睾丸等。这些受到刺激的腺体又能分泌各自特定的激素，并通过血液运送到最终靶组织的细胞上的或细胞内的激素受体上。每一个内分泌系统从中枢神经系统到最终靶组织都有一套类似的中转组织。

内分泌系统亦可通过反馈控制进行调整。在这种控制机制中，通常是（但不总是）通过最后一个内分泌腺分泌的激素在下丘脑水平上完成的。这是一种负反馈控制(图7—2)。例

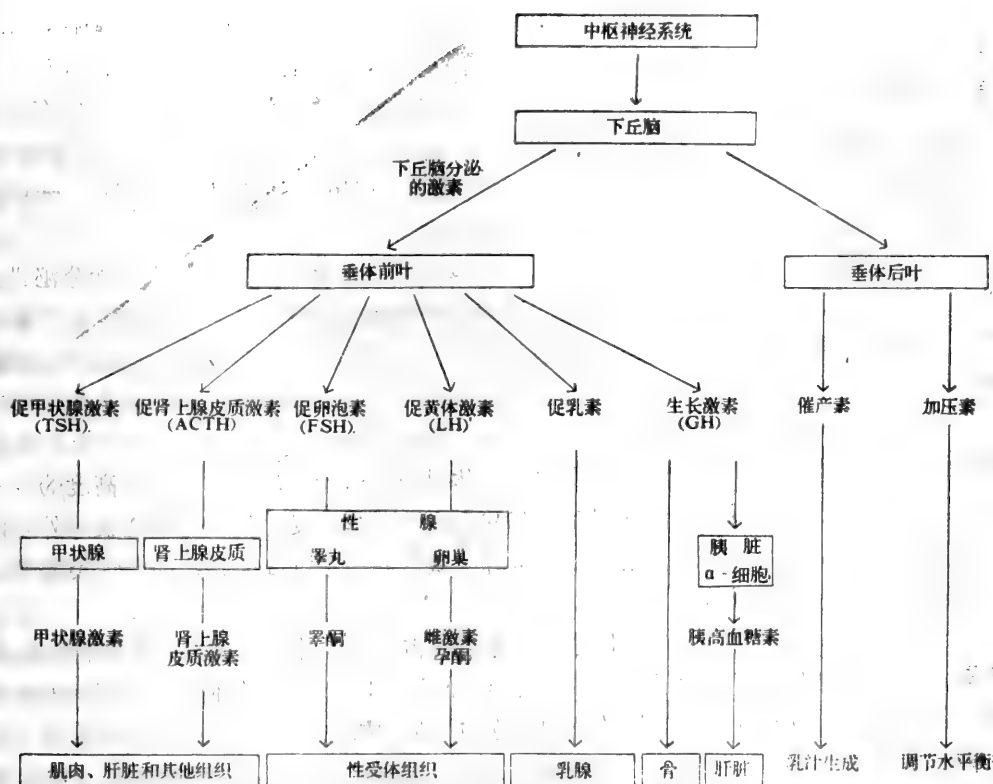


图7-1 内分泌腺和靶组织之间的调节关系

如，下丘脑释放出促甲状腺激素释放激素（TRH）并传递给垂体前叶，促进垂体前叶释放较多的促甲状腺素，后者又能刺激甲状腺释放甲状腺激素。甲状腺激素除作用于它们的靶组织并产生特定的激动效应之外，还可通过血液循环对下丘脑分泌促甲状腺激素释放激素以及垂体前叶分泌促甲状腺素造成反馈抑制。此外，下丘脑分泌的生长激素抑制素（Somatostatin）也能抑制促甲状腺激素释放激素的分泌。因此，一种激素的分泌或作用可能会受到其他激素的影响或调节。由此可知内分泌系统的活性是受到一种很复杂的调节网控制。

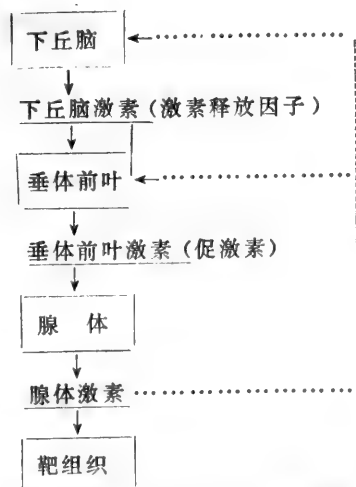


图7-2 内分泌系统的负反馈控制

五、激素的一般特征

激素在生物学上是强烈分子，只需极微量即可产生很显著的影响。在休止（resting）时，激素在血液中的水平只有 10^{-7} — 10^{-12} mol/ml。由于激素在机体内含量甚微，因此这对

它们的分离、鉴定或定量测定都带来极大的困难。尽管如此,由于使用了先进的技术如放射免疫实验技术以及其他有效的分离方法,大多数已知的哺乳动物激素已被分离纯化,许多蛋白质或肽激素的氨基酸顺序已被测定。当某种特定的激素的分泌受到刺激时,它在血液中的浓度就会升高,有时可升高几个数量级,在分泌休止时,激素的浓度很快回复到休止水平(resting level)。激素在血液中的寿命(life-time)很短,往往只有几分钟,一旦激素的存在不再需要,它们将很快被酶作用而使其失活。

有些激素到达靶细胞后会立即产生生理效应或生物化学反应。肾上腺素分泌进入到血液之后的几秒钟,肝脏即作出反响,立即将葡萄糖释放到血液中。与此相反,某些激素,例如甲状腺激素或雌激素在它们到达靶细胞几小时、甚至几天之后产生最大的反响。激素在反应时间上的这种差别是由于它们的作用方式不同所致。关于这个问题我们将在第二节中叙及。

激素作用的第一步是激素同它的专一性受体(Receptor)结合。激素的受体或是位于靶细胞的表面,或是位于靶细胞的胞质中。受体对与它结合的激素分子具有高度的专一性和亲和性。水溶性的蛋白质或肽激素以及氨基酸衍生物激素的受体位于靶细胞膜的外表面,因为这类激素不容易穿过细胞膜。脂溶性的甾醇类激素容易穿过细胞膜,因而这类激素的受体是位于胞质中的特异的蛋白质。

一旦靶细胞上或细胞内的受体分子被激素所占有,受体分子便经历一种特有的变化,这种变化使一种胞内的信息分子形成。这种信息分子常被称作第二信使(Second messenger)。第二信使便把从激素得到的信号转送到细胞中的某种酶或分子系统中,这种酶或分子系统执行由激素带来的指令。细胞内的信息或是调节特定的酶促反应,或是引发某个或某组无活性的基因表达。

第二节 激素作用的原理

激素通过改变机体内的不同过程例如酶促反应、基因的转录、离子的运输而发挥作用。但是,激素作为生物体内有活性的化学物质究竟是怎样引起靶细胞产生一系列生物效应的?这个问题一直是生物化学家们所注意研究的课题。通过大量的研究,有关激素作用的原理已经取得了很大的进展。现在一般认为激素主要是以两种不同的作用机制来发挥它们的作用。一种是有些激素最初与质膜上的特定的受体分子相互作用,导致细胞内的第二信使的产生,然后由第二信使激发出级联反应,并最终表现激素的生理效应。以这种机理起作用的激素主要是含氮激素(蛋白质和肽激素以及肾上腺髓质激素)。与此相反,有些激素则进入到细胞内,与胞内的特异受体分子相互结合,并引起特定基因的转录和翻译,甾醇类激素和甲状腺激素是以这种机制起作用的。

一、蛋白质和肽激素以及肾上腺髓质激素的作用原理

1. 第二信使学说

第二信使学说由 Sutherland 于1965年提出来的。他在研究胰高血糖素和肾上腺素促进肝脏糖元降解成葡萄糖的作用机制中发现,这两种激素能提高磷酸化酶的活性。后来又发现一种叫做磷酸酶(PH)能使磷酸化酶失活。这表明磷酸化酶的活性与该酶的磷酸化

有关。在有 $^{32}\text{P}_i$ 存在下，向肝脏切片加入胰高血糖素或肾上腺素，并一起保温，结果发现 $^{32}\text{P}_i$ 参入到磷酸化酶中去的速度可被这两种激素促进，并与这两种激素对糖元的降解效应成正比。这些研究揭示，磷酸化酶通过磷酸化而被激活，通过去磷酸化而失活。

后来通过用肝细胞匀浆研究激素对磷酸化酶的激活作用，发现肾上腺素或胰高血糖素仍能导致磷酸化酶的活性升高。但是，如果肝细胞匀浆被超离心后，其上清液对这两种激素的效应便消失了，若将超离心得到的颗粒(这种颗粒含有质膜)加回到上清液中时，激素的影响又恢复了。当把这种颗粒与这两种激素一起保温时，便产生了一种对热稳定的因子。把这种因子加入到上清液中也可以使磷酸化酶激活。后来经过鉴定，这种对热稳定的因子是腺苷 $3', 5'$ -单磷酸，即环 AMP(或 cAMP)。

cAMP是由腺苷酸环化酶催化合成的，该酶是一种膜结合蛋白，在有 Mg^{++} 存在下，它能催化 ATP 转变成 cAMP。反应是吸能的，大约需要 1.6 千卡/克分子的能量，但该反应可因焦磷酸(PP_i)的水解而推动。

根据上述研究结果，Sutherland 认为：一种神经递质或一种激素的作用，是在于把某种调节信息由分泌细胞带到靶细胞，因此激素是“第一信使”。含氮激素达到靶细胞后，本身并不进入细胞内部，而是通过细胞膜上的激素受体再激活腺苷酸环化酶，使 ATP 生成 cAMP。细胞内的 cAMP 浓度的改变，使靶细胞所特有的代谢活动发生变化。细胞代谢的这些变化则表现为各种生理效应。这里，cAMP 起到了把第一信使传来的信息传递到细胞内的作用，故把细胞内的 cAMP 称为激素作用的“第二信使”。

业已证明许多激素都以环 AMP 作为第二信使来发挥它们的生理效应(表7-1)。

2. 激素受体和腺苷酸环化酶

含氮激素的受体位于细胞膜的外表面，是一类膜结合蛋白。

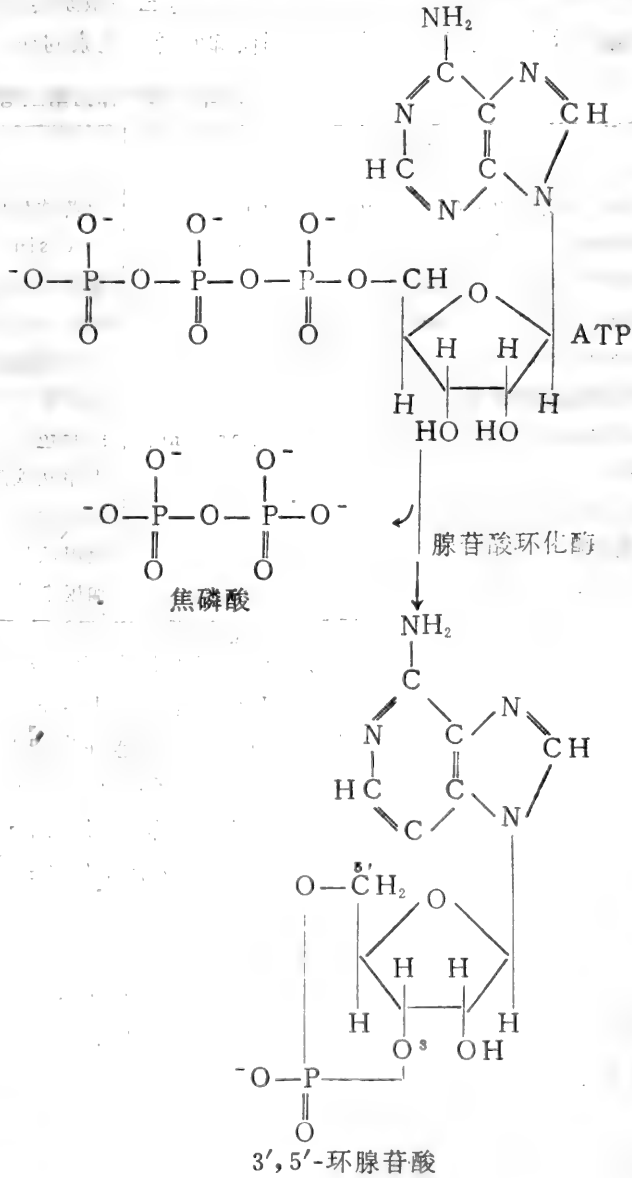


图7-3 环 AMP 的合成

除含有蛋白质成分外，有的受体还含有糖成分，有的还含有磷脂，有的则既含有糖又含有磷脂；而且受体分子在膜上的分布也是不均一的。激素受体的一个普遍的特征是，每一种受体对各自特定的激素具有高度专一的识别能力和亲和力。因此，当激素到达靶细胞膜上时，就与受体结合成激素-受体复合物。例如促肾上腺皮质激素 (ACTH) 只能与肾上腺皮质细胞膜上的受体结合，甲状腺激素 (TSH) 只能与甲状腺细胞膜上的受体结合。有的组织细胞能接受几种激素的刺激，是因为它含有几种相应的受体，这些受体除了具有各自独特的结构外，还具有与腺苷酸环化酶结合的共同结构。例如，脂肪组织对促肾上腺皮质激素、胰高血糖素和肾上腺素等三个完全不同的激素都能通过 cAMP 的增多使脂肪分解加强。在精确地研究了二种或三种激素的联合作用后，发现这三种激素是通过不同的受体而刺激相同的腺苷酸环化酶的活性，同时 β -受体阻滞剂仅抑制肾上腺素的作用，而对其他的两种激素则否。

表7-1 以环 AMP 作为第二信使的激素

激素名称	激素名称
促肾上腺皮质激素 (Adrenocorticotrophic hormone, ACTH)	促黄体生成激素释放激素 (Luteinizing hormone releasing hormone, LHRH)
降钙素 (Calcitonin)	促黑素细胞激素 (Melanocyte-stimulating hormone, MSH)
β -肾上腺素能的儿茶酚胺 (Beta-adrenergic catecholamines)	甲状旁腺激素 (Parathyroid hormone, PTH)
绒毛膜促进性激素 (Choriogonadotrophin, CG)	前列腺素 E_1 (Prostaglandin E_1)
促卵泡激素 (Follicle-stimulating hormone, FSH)	5-羟色胺 (Serotonin)
胰高血糖素 (Glucagon)	促甲状腺激素释放激素 (Thyrotropin-releasing hormone, TRH)
组胺 (Histamine)	促甲状腺激素 (Thyroid-stimulating hormone)
促黄体生成激素 (Luteinizing hormone, LH)	加压素 (Vasopressin).

由上可以理解到只有特异的组织而不是所有组织才能对一种(或几种)激素的刺激出现细胞内 cAMP 增多的反应。在任何特定组织中只存在一种或几种类型的激素受体。因此，在那个特定的组织中，腺苷酸环化酶的激素敏感性也被限制在一个很窄的范围内。由此可以看出，靶细胞膜上的受体乃是激素作用的组织特异性的直接控制者。

腺苷酸环化酶位于细胞膜的内表面，催化部位面向胞质。一般认为，许多组织的细胞膜上的腺苷酸环化酶在结构上是相似的，分子量大约是190,000。在 Mg^{++} 存在下，它能催化 ATP 转变成 cAMP。

最初认为激素的受体与腺苷酸环化酶是同一分子的两个亚单位，受体是调节亚单位，环化酶是催化亚单位。现在实验证明，激素的受体和腺苷酸环化酶不仅在物理位置上是两个独立的实体，而且在脂质双分子层范围内，它们能自由扩散和接触。当激素作用时，受体与腺苷酸环化酶相偶联而引起效应。

在受体与腺苷酸环化酶偶联机制研究中，发现了另外一种蛋白质，这个蛋白质叫做鸟苷酸结合调节蛋白 (Guanine nucleotide-binding regulatory protein)，简称 N 蛋白或 G 蛋白。该蛋白在受体与腺苷酸环化酶偶联中充当十分重要的角色。

目前所知，从兔肝中得到的 G 蛋白由分子量为42,000—45,000以及分子量分别为52000和35000的三个亚单位组成。它含有 GTP 的结合部位，可能还有氟离子 (F^-) 结合部位。此外，该蛋白还具有水解 GTP 的 GTP 酶(GTPase)活性，即能催化 GTP 水解。这种水解作用很可能代表每次酶激活循环的关闭机制。

GTP 是哺乳动物腺苷酸环化酶主要的调节物。GTP 和激素协调作用控制酶活性的水平(图7—4)。在受体-G 蛋白-环化酶系统中，每一个成员都能以“活性”和“无活性”两种状态存在，这两种状态的转变受 GTP 和激素两种调节配体的影响。在未受到刺激时，受体(R)是游离的，腺苷酸环化酶(C)也未同其他成员结合在一起，而且是处于低活性状态；G 蛋白(G)与 GDP 结合着(G-GDP)，这种 G-GDP 状态看来在生理上抑制该酶的活性。当一种激素(H)同它的专一的受体结合时，便形成一个起始复合物 (G-R)，并且设想，由于激素同受体的结合，诱导出受体的某种构象变化，这种变化导致 H-R 同 G 蛋白结合而形成一种短

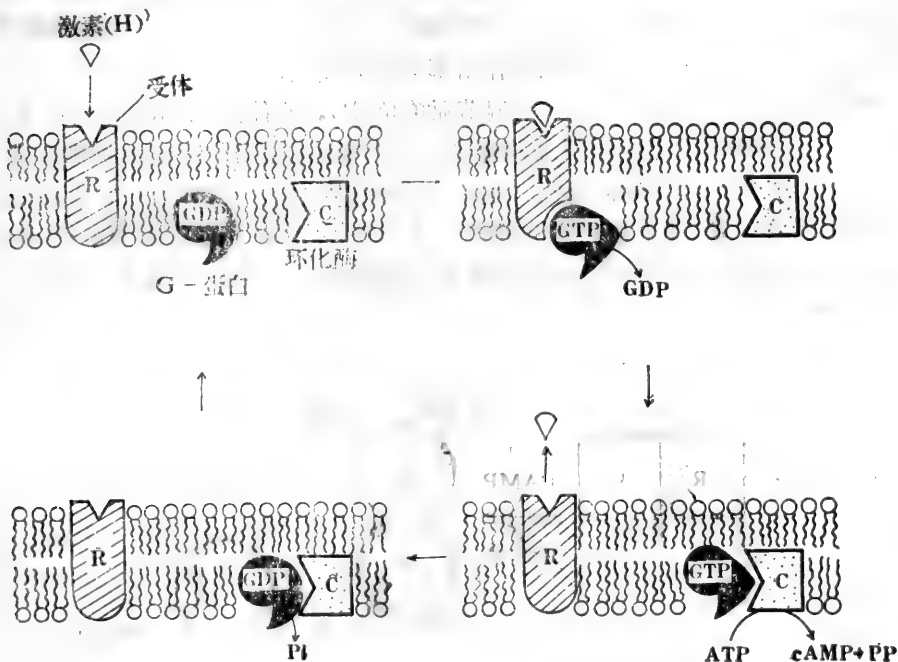


图7—4 激素和 GTP 协调作用控制腺苷酸环化酶的活性。

暂的复合物 H-R-G。与此同时，随伴 H-R-G 三元复合物的形成，GDP 同 G 蛋白解离，继之 G 蛋白同 GTP 结合。GTP 与 G 蛋白的相互作用使得三元复合物解离，产生 H、R、以及 G-GTP。G-GTP 看来是环化酶的生理活化剂。G-GTP 与环化酶(C)相互作用形成 G-GTP-C 复合物，并且认为这种形式代表环化酶的活性状态，它能增大 cAMP 的生成速度。由于 G 蛋白具有ATP 酶的活性，使 GTP 水解成 GDP，故这种活性状态是短暂的。接着 G-GDP 与环化酶解离，环化酶重新变成无活性的状态。只要激素仍然同受体结合，上述激活循环又可出现。这里 G 蛋白作为一种“偶联”单位。关键所在是 H-R-G 复合物的形成，它能引发 GTP 和 GDP 在 G 蛋白上进行交换。当激素水平很低时，几乎所有的 G 蛋

白与 GDP 结合成 G-GDP, 几乎所有的腺苷酸环酶也以无活性的形式存在。

3. 蛋白激酶

cAMP 是怎样影响不同细胞内的各种代谢活动、从而表现出不同的生理效应的? 这些不同的细胞过程是否具有共同性? 大量的研究证明, 作为激素作用的第二信使的 cAMP 的所有已知的作用都是通过蛋白激酶(Protein kinases)的激活引起的。迄今所有被研究过的细胞都含有依赖于 cAMP 的蛋白激酶, 它们都能被浓度约为 10^{-8} mol/L 的 cAMP 激活。这些蛋白激酶通过使不同细胞中的或相同细胞中的酶或蛋白质磷酸化来调节它们的活性。例如, 在肝细胞中, 被 cAMP 激活的蛋白酶能使糖元合成酶和糖元磷酸化酶磷酸化。前者磷酸化后即无活性, 后者磷酸化后则才能表现出活性。肾上腺素或胰高血糖素促进肝细胞糖元分解、抑制糖元合成, 从而升高血糖的生理效应都是通过 cAMP 激活的蛋白激酶的作用实现的。在脂肪细胞中, 也是通过 cAMP 激活的蛋白激酶的作用, 使脂肪酶磷酸化而被激活, 从而引起脂肪的分解。通过上面的例子可以说明, 不同组织中都有蛋白激酶, 然后再通过蛋白激酶使不同细胞内的其他不同的酶或蛋白质磷酸化, 从而表现出各组织细胞特有的生理效应。同时还可以说明并不是所有的磷酸化作用都会使酶或蛋白质激活。

蛋白激酶由两种亚单位组成, 一种是调节亚单位(R), 它能同 cAMP 结合; 另一种是催化亚单位(C)。在 cAMP 缺乏或量不足的情况下, 调节亚单位和催化亚单位形成 R_2C_2 复合物(图7—5), 这个复合物无酶促活性。当有 cAMP 存在时, cAMP 同每个调节亚单位结合而导致 R_2C_2 解离成 R_2 亚单位和两个游离 C 亚单位。这两个游离的亚单位具有酶促活性。因此, cAMP 同调节亚单位的结合解除了调节亚单位对催化亚单位的抑制。这里, cAMP 起一种别构效应物的作用。

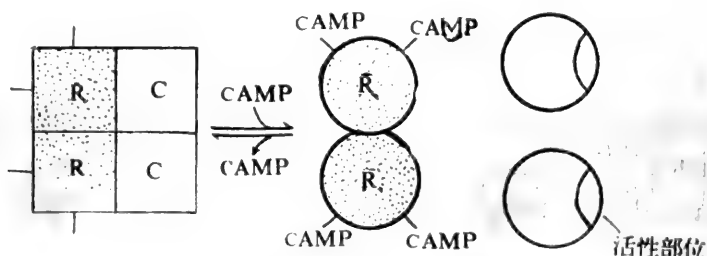


图7—5 蛋白激酶的激活示意图

通过上面的介绍, 我们可以看出, 激素专一的受体控制着激素作用的组织特异性, 而激素作用的生物效应则是通过第二信使 cAMP 激活的不同组织细胞中的蛋白激酶实现的。

4. 磷酸二酯酶和磷蛋白磷酸酶

只要激素继续分泌, 并继续与受体结合, 那么靶细胞内的 cAMP 就能继续维持比较高的水平。但是, 一旦激素的分泌停止, 结合到受体上的激素即解离下来, 随之被酶降解, 腺苷酸环化酶通过 G 蛋白与受体的“偶联”也被破坏, 致使它重新转变成无活性的状态, cAMP 不再合成, 细胞内的 cAMP 就被另外一种酶磷酸二酯酶水解变成 AMP, 失去第二信使的作用。蛋白激酶的两亚单位重新结合恢复到它的无活性状态。由蛋白激酶催化产生

的各种被磷酸化的酶或蛋白质随即也被一种叫做磷蛋白磷酸酶的酶水解去磷酸化。至此，激素的作用也就消失了。

5. 钙离子和 cGMP 的作用

有些激素例如肾上腺素、加压素、血管紧张素和胰高血糖素等都能改变细胞内钙离子的浓度和分布，使其作为激素作用的细胞内信号，改变某些酶的酶促反应速度。因此，许多细胞功能都受胞液中 Ca^{++} 浓度的调节。基于这样的理由，象 cAMP 一样，亦可把 Ca^{++} 视为激素作用的第二信使。

有些激素能够使胞外的 Ca^{++} 流入到靶细胞内，而有些激素则能使 Ca^{++} 从细胞内的贮存部位例如线粒体迁移到胞液中。

激素通过 Ca^{++} 调节细胞内代谢反应的主要机制是：钙离子首先同一种叫调钙蛋白 (Calmodulin) 的 Ca^{++} 结合蛋白结合，然后这种 Ca^{++} 调钙蛋白复合物同钙离子敏感的酶结合，以改变该酶的活性 (图7-6)。调钙蛋白广泛地分布在各种动物体内。所有动物体内的调钙蛋白的氨基酸顺序几乎都是相同的，因此它是最古老最保守的动物蛋白之一。

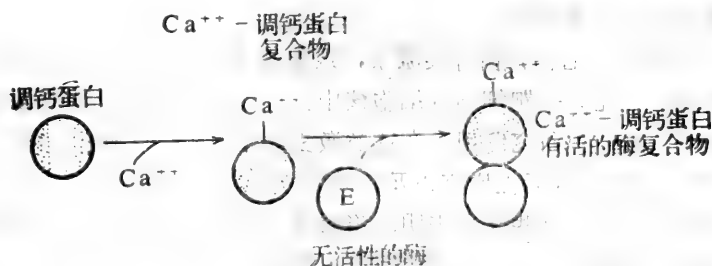


图7-6 钙离子作为第二信使调节胞内反应的机制

环腺苷酸和钙离子这两种信使系统之间是相互联系的。例如，当肾上腺素刺激心脏时，作为腺苷酸环化酶被激活的结果，细胞内的环腺苷酸浓度升高；作为质膜去极化的结果，促进钙离子进入细胞，从而导致胞内钙离子浓度升高。在肾上腺素调节肝糖元分解中，cAMP 和 Ca^{++} 起着双重作用。肾上腺素经依赖于 cAMP 的蛋白激酶激活糖元磷酸化酶，从而刺激糖元的分解。 Ca^{++} -调钙蛋白复合物也能以不同的方式激活糖元磷酸化酶，也刺激糖元的分解。此外， K_m 高的 cAMP 磷酸二酯酶几乎在所有组织中都可被 Ca^{++} 调钙蛋白复合物激活，促进 cAMP 的水解，降低 cAMP 的浓度。

3',5'-环鸟苷酸 (简称环 GMP 或 cGMP) 是一种与 cAMP 结构相类似的环核苷酸，它可以通过鸟苷酸环化酶由 GTP 产生：



鸟苷酸环化酶在所有哺乳动物组织中都存在。但它与腺苷酸环化酶不一样，它存在于细胞的颗粒部分和可溶性部分中。组织中的 cGMP 的水平一般比 cAMP 低 5%。许多激素和其他效应物都能改变组织中的 cGMP 的浓度，例如胰岛素、乙酰胆碱、生长激素抑制素、血管

紧张素以及前列腺素等都能增高它的水平。因此就产生了这样一种假说,即 cGMP 可以作为这些激素作用的第二信使,象 cAMP 可以作为其他许多激素的第二信使一样。并且还假定 cGMP 所起的作用与 cAMP 所起的作用是相反的。但至今还没有清楚地证明 cGMP 以这种方式起作用。在很多情况下,激素和其他效应物之所以能增高环 GMP 的水平,是由于这些激素能引起 Ca^{++} 流进到细胞中, Ca^{++} 本身就是鸟苷酸环化酶的有效激活剂。鸟苷酸环化酶也能被氧化反应和某些脂类激活。但是,激素并不直接激活破碎细胞制剂中的鸟苷酸环化酶。因此, cGMP 的生理作用目前仍不肯定。

依赖于 cGMP 的蛋白激酶在许多哺乳动物组织中发现。这类蛋白激酶的激活方式是:



(无活性的形式) (有活性的形式)

可是,目前几乎没有具体的证据证明任何被这类酶磷酸化的底物是以生理上相应的方式改变的。

二、甾醇类激素的作用原理

1. 甾醇类激素作用一般概况

六十年代用氘 (^3H) 标记各种甾醇类激素,跟踪这类激素在体内的去向,结果发现激素分子集中到靶细胞中,尤其是靶细胞的细胞核中。这说明,甾醇类激素必须进入到细胞内才能发挥它们的作用。进一步研究发现,在这类激素的作用下,在哺乳动物中可以观察到以 DNA 为模板的 RNA 聚合酶的活性增高以及 mRNA 合成速度也增高的现象,并且某些蛋白质的合成速度也随之升高。这些结果表明,甾醇类激素在染色体水平上影响基因的表达,而不是象含氮激素那样影响酶的活性或运输过程。虽然,甾醇类激素的作用在细节方面可能存在着个体差异,但是那些主要的甾醇类激素在作用原理方面基本上是相似的。这些激素包括雌激素,雄激素、肾上腺皮质激素等。甲状腺激素属于氨基酸衍生物激素,据研究,认为它们的作用机制与甾醇类激素相似。

甾醇类激素作用的基本过程已经确定(图7-7)。这些过程包括:①激素进入细胞内,与细胞质中的专一性受体结合,形成激素-受体复合物;②激素-受体复合物移位到细胞核中,并结合到染色体特定的部位上;③激活特定基因使其转录;④合成特异的酶或蛋白质,从而导致细胞功能的变化。下面就甾醇类激素的作用作些必要的说明。

2. 甾醇类激素与受体的结合

甾醇类激素通过扩散穿过疏水的质膜进入到靶细胞的胞质中。虽然也不排斥存在某种运载机制协助激素越过细胞膜,但这种机制并没有证实。一旦激素分子进入到胞质中,便同可溶性的特定的受体蛋白结合。甾醇类激素的受体通常只在一定限量的靶组织中找到,但糖皮质激素除外。糖皮质激素的受体几乎在所有哺乳动物细胞中发现。

甾醇类激素同它们的细胞质受体结合,诱导受体的构象发生变化,使受体激活。这种变化导致激素-受体复合物移位到细胞核中,并增高激素-受体复合物同它的核结合部位相结合的亲和力。例如雌激素的受体,它们的激活伴随着沉降系数从 4S 到 5S 的变化。显然,这种变化表示受体结合了第二个亚单位。当然,受体的构象变化(或激活)并不都是表现沉

降系数增大。在有些情况下，受体的激活也可能表现出沉降系数变小或不变的现象。激素-受体复合物亦可视为激素作用的“第二信使”。

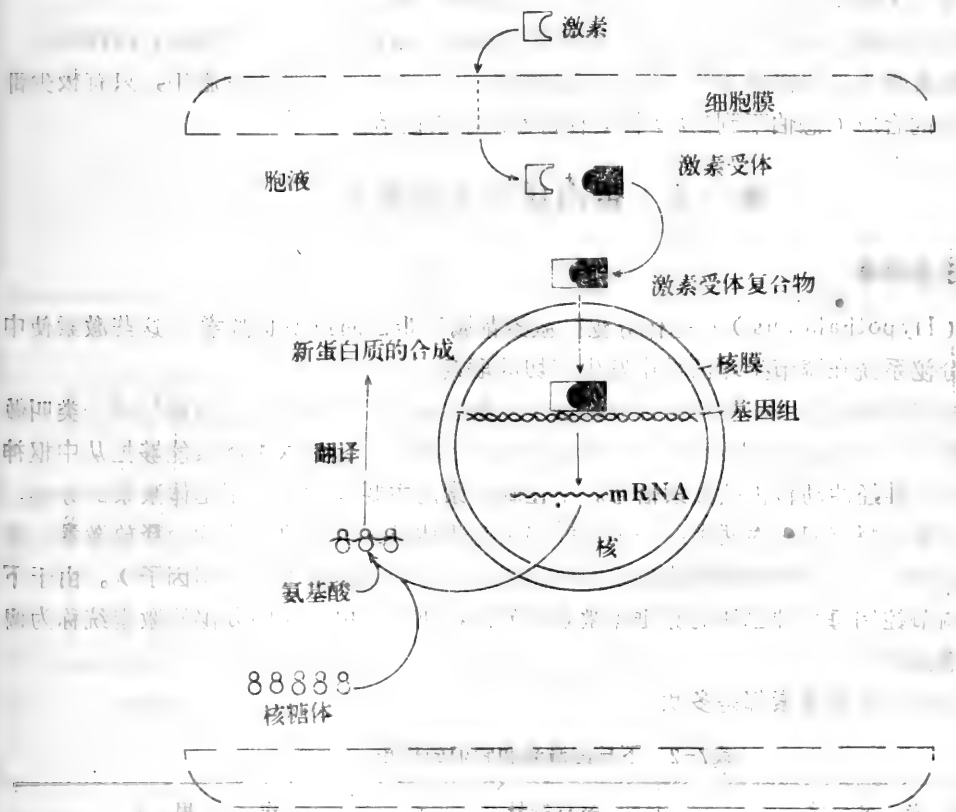


图7-7 甾醇类激素作用的分子机制

3. 激素-受体复合物对基因转录的影响

用纯化的受体和核组分作实验表明，激素-受体复合物既能够同纯化的 DNA 结合，也能同染色体结合。但是，激素-受体复合物同靶细胞纯化的 DNA 的结合是低亲和力的、非专一的，而同靶细胞染色体的结合是高亲和力的，并对靶细胞非组蛋白染色体蛋白有明显的专一性。若把靶细胞核中的能同激素-受体复合物结合的非组蛋白染色体蛋白同非靶细胞中相同部位的非组蛋白染色体蛋白进行交换，则可得到交换性“杂交”染色体。这时，再把激素-受体复合物加到实验体系中，激素-受体复合物则只能与非靶细胞的染色体结合，而不能同靶细胞中的染色体结合，因为已经把能同该复合物结合的特定的非组蛋白染色体蛋白从靶细胞交换到非靶细胞的染色体上了。由此可见，激素-受体复合物在靶细胞核中的结合部位是在特定的非组蛋白染色体蛋白上。这是很容易理解的，因为就同一种生物来说，它的基因组 DNA 是相同的，与 DNA 结合的组蛋白的种类也很少，在不同组织都相同，而酸性的非组蛋白染色体蛋白的种类很多，而且它们在不同的组织中也有很大的差异。

在靶细胞的核中，被结合的激素-受体复合物的作用是在转录水平上调节特定基因的表达。例如，用未成熟的母鸡输卵管作材料进行研究（因为输卵管对雌激素是敏感的），表明

雌激素诱导主要的蛋白质——卵白蛋白的合成。在该实验系统中，雌激素增高了 RNA 聚合酶的转录起始部位的可用性。此后不久即可观察到卵白蛋白浓度增高的现象。这里，激素就起到了使特定的 DNA 顺序（基因）可被 RNA 聚合酶转录的作用。

以上述方式起作用的激素，一般只有合成某种相应的蛋白质，才能表现出它的作用。

甾醇类激素改变基因转录速度的作用是高度专一的。在一个典型的细胞中，只有极少部分的细胞蛋白的合成（恐怕不到1%）被某种特殊的激素调节。

第三节 蛋白质和多肽激素

一、下丘脑激素

下丘脑（Hypothalamus）和垂体分泌的激素都属于蛋白质或多肽激素。这些激素使中枢神经和内分泌系统在调节生理活性中发生密切的联系。

下丘脑是中枢神经系统的一特化部分，位于大脑的底部。下丘脑分泌细胞分泌一类叫做神经内分泌转导体（neuroendocrine transducers）的激素，因为这类激素能够把从中枢神经系统所接受的神经冲动转化成激素信号。下丘脑激素的主要作用是控制垂体激素的分泌。根据其作用性质可将它们分为两类：一类是能够引起垂体激素的释放，故称为释放激素（或释放因子）；另一类是能够抑制垂体激素的分泌，故称为抑制激素（或抑制因子）。由于下丘脑激素能调节控制每一种已知的腺垂体激素的分泌，所以把由下丘脑分泌的激素统称为调节激素或调节因子。

所有已知的下丘脑激素都是多肽。

表7-2 下丘脑激素和它们的作用

激 素 名 称	缩写符号	作 用
促肾上腺皮质激素释放激素	CRH	促进促肾上腺皮质激素的释放
促甲状腺激素释放激素	TRH	促进促甲状腺激素的释放
促黄体（生成）激素释放激素/ 促滤泡激素释放激素	LHRH/ FSHRH	促进促黄体（生成）激素、促滤泡激素的释放
生长激素释放抑制激素	GHRH（或 Somatostatin）	抑制生长激素的释放
生长激素释放激素	GHRH	促进生长激素的释放
促乳素释放抑制激素	PIH(PIF)	抑制促乳素的释放
促乳素释放激素	PRH(PRF)	促进促乳素的释放
促黑（素细胞）激素释放抑制素	MIH(或MRIH)	抑制促黑（素细胞）激素的释放
促黑（素细胞）激素释放激素	MRH	促进促黑（素细胞）激素的释放

下丘脑激素的分泌的控制是复杂的。每种神经元（neuron）的分泌活性是两种主要影响的整合结果。一种是神经方面的，另一种是激素方面的。从中枢神经系统的不同区域带来的各种神经信号集中在下丘脑细胞上。这些神经信息对下丘脑激素的分泌或是促进或是抑制。垂体和其他多许内分泌腺分泌的激素可对下丘脑激素的分泌起反馈作用。

二、垂体激素

垂体实际上由三个在功能上和解剖学上不同的部分组成，即垂体前叶、中叶和后叶。但在人体中，在垂体前叶和后叶这两部分之间只有一褪化的中叶。垂体前叶和中叶是腺垂体，垂体后叶是神经垂体。

1. 腺垂体激素

腺垂体激素是由垂体腺性细胞形成的。腺性细胞产生三类激素，它们调节着完全不同的过程，包括生殖功能、生长、乳汁生成以及肾上腺皮质、甲状腺和两性生殖腺等内分泌腺的

表7-3 腺垂体激素及其作用

激 素	主要作用部位	主要作用
I. 促肾上腺皮质激素-促脂解激素类		
促肾上腺皮质激素 (ACTH)	肾上腺皮质 脂肪组织	肾上腺皮质激素的形成、分泌 脂类的释放
α -和 β -促脂解激素	脂肪细胞	脂类的释放
α -、 β -和 γ -内啡肽	脑 肠胃道	疼痛知觉，垂体激素的分泌 减少肠胃道运动
Met-脑啡肽 Leu-脑啡肽	和内啡肽相同	和内啡肽相同
α -、 β -促黑(素细胞)激素	黑素细胞	色素分散，伴随皮肤变黑
促肾上腺皮质激素样的中间肽	胰岛细胞(?)	胰岛素的分泌(?)
II. 糖蛋白激素类		
促黄体(生成)激素或称促间质细胞激素 (LH 或 ICSH)	卵巢 睾丸	黄体化、孕酮的分泌 间质组织的发育，雄激素分泌
促滤泡素(FSH)	卵巢 睾丸	滤泡的发育；和LH一起，促进雌 激素的分泌，排卵 精小管发育，精子发生
促甲状腺激素(TSH)	甲状腺 脂肪组织	甲状腺激素的形成和分泌 脂类的释放
III. 引起生长和催乳的激素		
生长激素	普遍	骨和肌肉的生长；影响钙、磷和氮 的代谢；影响糖、脂的代谢。
促乳素	乳腺	促进乳汁分泌

激素分泌的控制。所有垂体前叶和中叶激素的分泌本身也受到下丘脑分泌细胞释放的激素的控制。

腺垂体激素的种类、作用部位以及它们的主要作用列于表7-3。

(1) 促肾上腺皮质激素

促肾上腺皮质激素 (Adrenocorticotropin, ACTH) 能促进肾上腺皮质的生长, 并促进肾上腺皮质激素的合成和分泌。

促肾上腺皮质激素的化学本质是多肽。从人、猪、牛以及羊的垂体中分离出来的 ACTH 是由 39 个氨基酸基组成的。图7-8是人 ACTH 的氨基酸顺序。比较几种不同来源的 ACTH 的一级结构后发现, 从第一个残基到第24个残基的氨基酸种类和顺序是相同的。人工合成的这一段顺序具有同完整的 ACTH 相同的生物活性。但用亮氨酸氨肽酶除去氨基末端的丝氨酸残

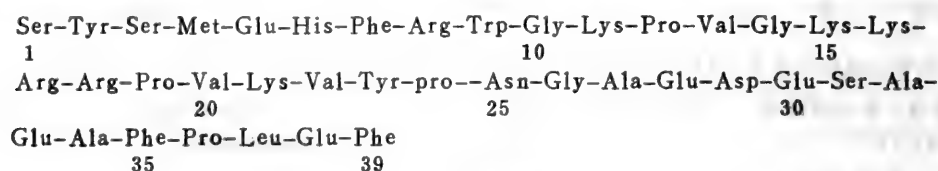


图7-8 人 ACTH 的aa 顺序

基, 则导致它的生物活性的丧失。所以第 1 到第24这一段氨基酸顺序是 ACTH 生物活性所必需的, 而第25到39的这一段顺序对激素的活性是非必需的, 但这些残基对于该激素的种属免疫特异性却是重要的。人工合成 ACTH 前面的16个残基即可表现出活性, 当肽链延伸到第19个残基时, 生物活性显著提高。这表明, Lys-Lys-Arg-Arg 四个碱性氨基酸对该激素的活性表现出高的效力。此外, 由残基 1 到残基13构成的片段具有促黑 (素细胞) 激素所具有的活性, 与促黑 (素细胞) 激素的氨基酸顺序完全相同或基本相同。

ACTH 亦能促进 RNA 的合成和 DNA 含量的增高, 这与肾上腺皮质内的细胞的增殖有关。此外, 亦还具有促进脂肪组织脂解、促进胰岛 β -细胞分泌胰岛素以及垂体前叶分泌生长激素等作用。

ACTH 对肾上腺皮质的作用与一般含氮激素作用的方式相同。首先, ACTH 同肾上腺皮质细胞质膜上的专一性受体结合, 随即激活腺苷酸环化酶, 从而增加 cAMP 的浓度, 并导致肾上腺皮质激素合成的一系列生化反应事件。ACTH 对腺苷酸环化酶的激活需要 Ca^{++} 。

ACTH 和 β -促脂解激素 (LPH) 以及其他几种生物活性肽、包括 α - 和 β -促黑 (素细胞) 激素 (MSH)、促肾上腺皮质激素样中间肽 (CLIP)、 γ -促脂解激素、 α -、 β -、 γ -内啡肽以及脑啡肽等看来都是从一个共同的前体 (分子量约为31,000) 衍生而来的。这个共同的前体叫做前促肾上腺皮质激素或前鸦片样肽促 (肾上腺) 皮质激素原。因为 ACTH 和鸦片样肽 (Opioid peptides) 都可以从这个前体衍生而成。图7-9 表示上述各种激素与这个前体之间的关系。

(2) 促性腺激素

人体促性腺激素包括促黄体 (生成) 激素 (促间质细胞激素) 和促滤泡素 (又称促卵泡素)。人体胎盘绒毛膜促性腺激素 (hCG) 也是人体内的一种促性腺激素。

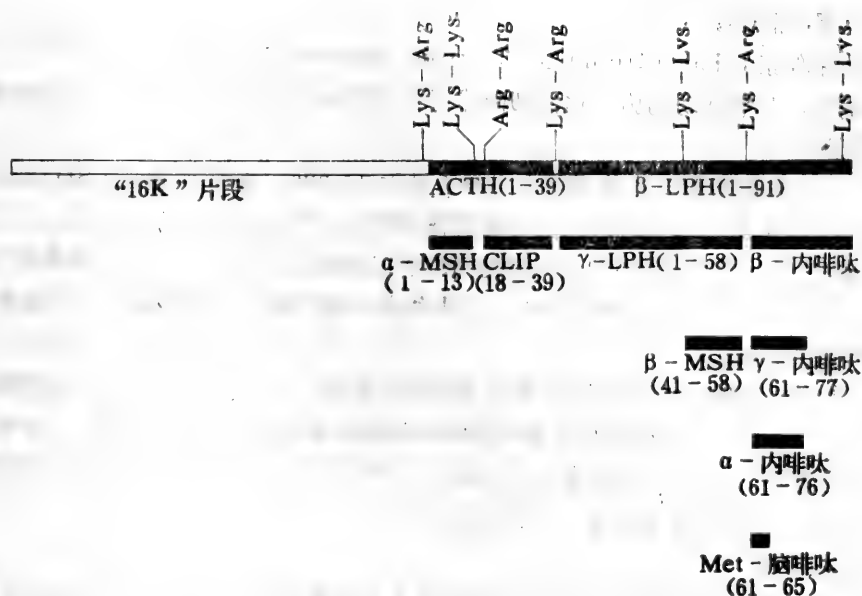


图7-9 ACTH、 β -LPH 等与原体之间的位置关系
(括弧中的数字代表该激素在前体分子中的氨基酸顺序位置)

人促黄体(生成)激素、促滤泡激素、胎盘绒毛膜促性腺激素以及促甲状腺激素都是由 α -和 β -两个亚单位构成的糖蛋白。这两个亚单位借非共价键结合在一起。在同一种动物体中,这些糖蛋白激素的 α -亚单位都是相同的,而每种激素的 β -亚单位则是不同的,并且具有不同的生物特性和免疫特性。这表明,这几种激素所特有的生理活性是由 β -链决定的。当 α -亚单位和 β -亚单位各自单独存在时都没有生物活性,但若把两者结合起来时, β -亚单位固有的全部生物活性就恢复了。在体外,每种激素的 α -亚单位能同其他任何一种激素的 β -亚单位结合,产生呈现 β -亚单位的生物活性的杂交体。

在雌性动物中,促滤泡激素(FSH)刺激囊状滤泡大量生成并伴随卵巢的重量增加。在卵巢滤泡的最后成熟中,需要有促黄体(生成)激素(LH)的参与。LH与FSH协同作用,激发滤泡的最后的成熟,诱导排卵并使粒细胞变成黄体细胞,最后形成黄体。黄体的维持及黄体分泌孕酮也受LH的控制。

在雄性动物中,LH刺激睾丸间质细胞的发育,分泌雄性激素——睾酮,所以LH又叫做促间质细胞激素(ICSH)。FSH刺激精小管上皮细胞,在发育过程中引起精母细胞(Spermatocyte)大量出现,包括产生精子。

尽管绒毛膜促性腺激素(CG,人体称为hCG)是胎盘器官产生的,但它的生物效应却与垂体前叶分泌的LH的生物效应非常相似。这并不奇怪,因为在人体中,两者除了 α -亚单位完全相同外,两者的 β -亚单位的氨基酸顺序有80%是相同的。hCG在怀孕的头4—6周内能维持黄体(Corpus luteum)。

LH、FSH、和hCG作用方式也与一般含氮激素的作用方式相似。LH和hCG看来

与同一受体作用，而 FSH 的受体则是不同的。

(3) 促甲状腺激素

促甲状腺激素 (Thyrotropin 或 Thyroid-stimulating hormone, TSH) 是垂体前叶分泌的激素。对哺乳动物施行垂体切除术导致甲状腺衰退。可见，促甲状腺激素的作用部位是在甲状腺。

TSH 是一种糖蛋白。人体 TSH 的分子量为 28,000。如上所述，TSH 是由 α -和 β -两个亚单位非共价地结合而成的。在含硫蛋白质中，TSH 是含硫量最丰富的，在 α -和 β -亚单位内各自存在许多链内的（而不是链间的）二硫键。寡糖单位在两个亚单位中都存在。

TSH 从以下几个方面影响甲状腺：①从血液中摄取碘；②碘转换成甲状腺激素；③甲状腺分泌甲状腺激素。

TSH 分泌亢进时，会引起甲状腺激素分泌过多症。但在正常情况下，当甲状腺激素分泌至一定量时，则可对垂体前叶分泌 TSH 有反馈抑制作用，停止 TSH 的分泌。另外，TSH 的分泌也受到两种下丘脑因子的控制，一种是生长激素释放抑制素（起抑制作用），另一种是促甲状腺激素释放激素（起促进作用）。

(4) 生长激素

生长激素 (Growth Hormone, 简称 GH) 是由垂体前叶分泌的一种蛋白质激素。已知几种不同种属来源的 GH 都是由 191—199 个氨基酸残基构成的单链蛋白。人的 GH 由 191 个氨基酸残基组成，分子量为 21,000。链内含有两个二硫键（图 7-10）。GH 的生物活性有很强种属特异性。

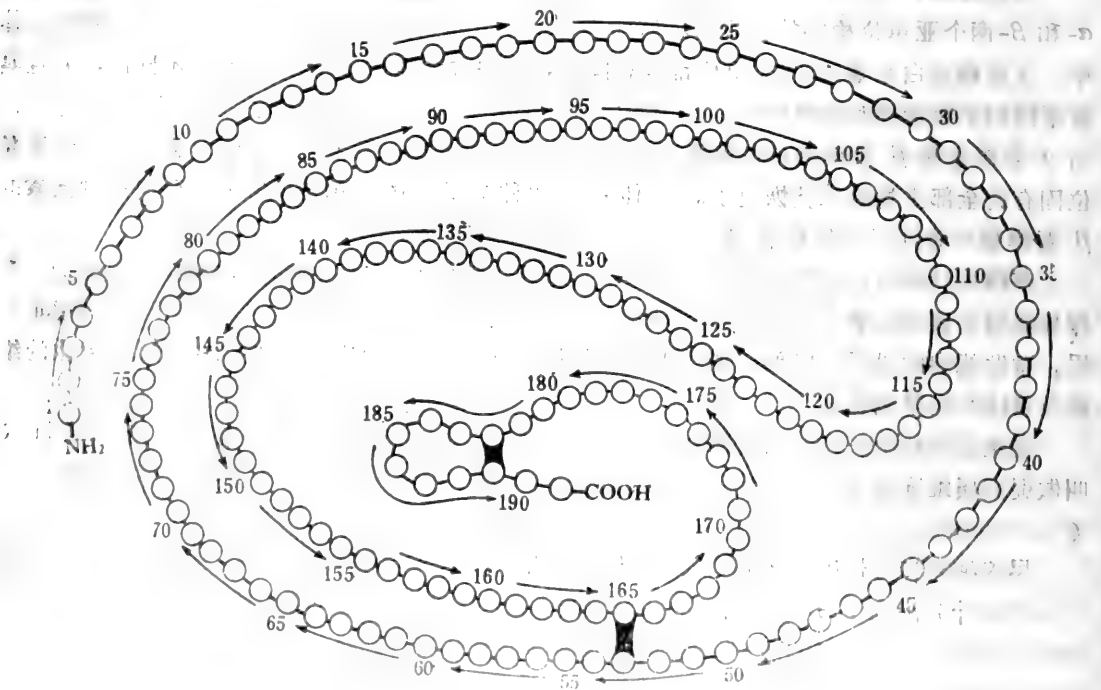


图 7-10 人生长激素的一级结构示意

生长激素的功能非常广泛。除神经组织外，几乎所有组织对 GH 的刺激都能产生效应。但 GH 的主要功能是促进骨和软骨的生长，促进粘多糖和胶原的合成。它还影响蛋白质、糖类和脂类的代谢，最终影响体重的增加。

生长激素是从两个方面发挥作用的，一个是直接的，另一个是间接的。这两方面的作用都是从 GH 同特定的质膜受体结合部位结合而开始的。其中，直接的影响是对某些代谢的作用，例如脂解作用、抗胰岛素的作用以及灵长目动物的催乳作用等。关于 GH 的这些直接作用，还没有发现一种统一的明确的生化根据，例如某种第二信使的存在。

GH 许多特殊的作用看来是通过一类依赖于生长激素的肽或蛋白质而间接发挥的。这类肽叫做生长调节素 (Somatomedins)。这些生长调节素的分子量约为 7,000—10,000，一般都是从原生质或血清中分离得到的，在组织中并不大量存在。这类生长调节素在 GH 的影响下，主要由肝脏合成，其浓度受 GH 的调节。

表7-4 几种不同的生长调节素

种 类	分 子 量	等 电 点	来 源
生长调节素A ₁	≈7000	中 性	人原生质
生长调节素A ₂	≈7000	中 性	人原生质
生长调节素C		碱 性	人原生质
胰岛素样的生长子 I (IGF-I)	7649	碱 性	人原生质
胰岛素样的生长子 II (IGF-II)	7471	中 性	牛血清
刺激增殖的活性 (Multiplication stimulating activity)	≈10000	中 性	肝细胞培养物

这些不同的生长调节素有多种生物活性 (表7-5)，包括促进软骨和生长的活性、象胰岛素一样的影响脂肪和肌肉组织的活性、以及促进细胞增殖的活性等。生长调节素的效应 (或作用) 是通过同特异的膜受体部位的结合而引发的。

生长激素分泌的控制是很复杂的。各种不同的生理上的或药物上的刺激都会影响垂体分泌生长激素的速度，其中大多数因素对生长激素分泌的影响最终都是通过共同的途径实现的，即通过它们影响两种下丘脑调节因子——生长激素释放激素和生长激素释放抑制素——的分泌而实现对生长激素分泌的调节控制。幼年动物若 GH 分泌过多，则会过度高大，人若得此病，则成为畸形巨人，称巨人症；相反，若 GH 分泌不足，则过度矮小，人若得此病就成为侏儒。可见，生长

表7-5 生长调节素的组织效应

活 性	效 应
促软骨活性	氨基酸运输 RNA和 DNA 的合成 蛋白质的合成 硫酸软骨素的形成 胶原的合成
胰岛素样的活性 肌肉：	氨基酸运输 糖运输 糖元的合成 蛋白质的合成 脂：糖运输 葡萄糖氧化成 CO ₂ 葡萄糖转变成脂 抑制脂解
有丝分裂活性	细胞培养增殖

激素正常地分泌对于维持人体和其他动物正常的健康发育是必不可少的。

2. 垂体中叶激素

促黑（素细胞）激素（Melanocyte-stimulating hormone, 简称 MSH）是垂体中叶分泌的一种激素，可分为 α -和 β -两种类型。 α -MSH 为13肽，从不同来源的哺乳动物例如牛、羊、猪、马、大鼠及猴子的垂体分离出来的 α -MSH 都有相同的结构（图7—11）。人垂体 α -MSH 含量甚微。从上述动物中分离出来的 β -MSH 为18肽。不同来源的 β -MSH在结构上有些微小的差别。

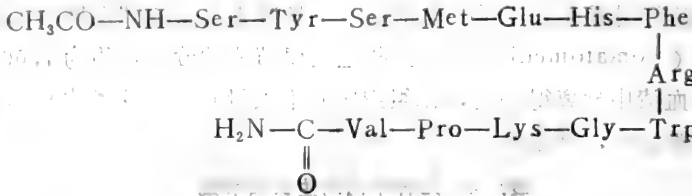


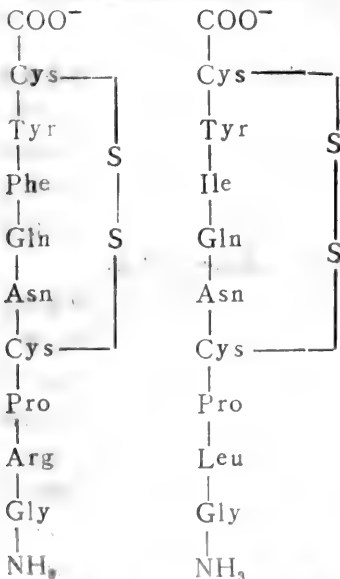
图7—11 α -MSH 的氨基酸顺序

α -MSH 和 β -MSH 在结构上分别与 ACTH 和 β -LPH 有密切的关系（图7—10）。

α -MSH 和 β -MSH 的分泌主要受两种下丘脑激素控制：一种是促黑（素细胞）激素释放激素（MRH），它促进MSH 的分泌；另一种是促黑（素细胞）激素释放抑制激素（MIH 或MRIH），它抑制MSH 的分泌。

3. 垂体后叶激素

哺乳动物垂体后叶分泌的激素有加压素（Vasopressin）或抗利尿激素（Antidiuretic hormone）和催产素（Oxytocin）两种。这两种激素其实并不是在垂体后叶中产生的，它们在下丘脑合成之后，经过专一的载体蛋白——后叶激素运载蛋白（Neurophysins）转运到垂体后叶贮存起来，当受到刺激时，再从后叶分泌到血液中去。



（精氨酸）加压素（牛） 催产素（牛）

图7—12 两种垂体后叶激素的氨基酸顺序

加压素和催产素都是由九个氨基酸残基构成的九肽或八肽（因两个 Cys 借-S-S-连接成为一个胱氨酸，故文献中常称为八肽）（图7—12）。来自人、牛、羊、马、大鼠和鱼的加压素的第八位是精氨酸，故又称为精氨酸加压素，而猪的加压素第八位则是赖氨酸，称为赖氨酸加压素。

实验证明，加压素和催产素分子结构中的二硫键对它们的生物活性很重要，若二硫键被破坏，则导致其生物活性丧失。

加压素的主要生理作用是调节体液平衡。它能促使小动脉和毛细血管对水分的重吸收，减少排尿，故又称为抗利尿激素。加压素无种属特异性。

催产素促进子宫及乳腺平滑肌收缩，具有催产和促进乳腺排乳的作用。

三、胰脏细胞分泌的激素

胰脏有两个主要的功能。一是合成一些酶，例如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶，以及羧肽酶等，它们被分泌到小肠，并在那里消化食物，这种功能是通过外分泌细胞（腺泡）执行的。另一个是合成胰岛素、胰高血糖素、生长激素抑制素以及胰多肽（表7—6），这些激素调节葡萄糖和其他主要营养物的代谢，这个功能由胰脏的内分泌组织——胰岛细胞完成。

表7-6 胰脏分泌的激素

来 源	激 素	来 源	激 素
α -细胞 (A细胞)	胰高血糖素	D-细胞	生长激素抑制素
β -细胞 (B细胞)	胰岛素	F-细胞	胰多肽

1. 胰岛素

胰岛素是胰岛 β -细胞分泌的一种蛋白质激素，它的分子量为5734，由51个氨基酸残基构成A、B两条链（图3—20）。A链由21个氨基酸构成，B链含有30个氨基酸残基。两条链之间通过两个二硫键相连。A链内还有一个二硫键。

有生理活性的胰岛素是由它的无活性的前体胰岛素原 (Proinsulin) 经过酶促激活转变而成的。胰岛 β -细胞合成的胰岛素原比胰岛素大, 因不同种属而异, 大约由 78—86 个氨基酸残基构成。牛的胰岛素原含 81 个残基, 其结构如图 7—13 所示。胰岛素原是一条单一的多

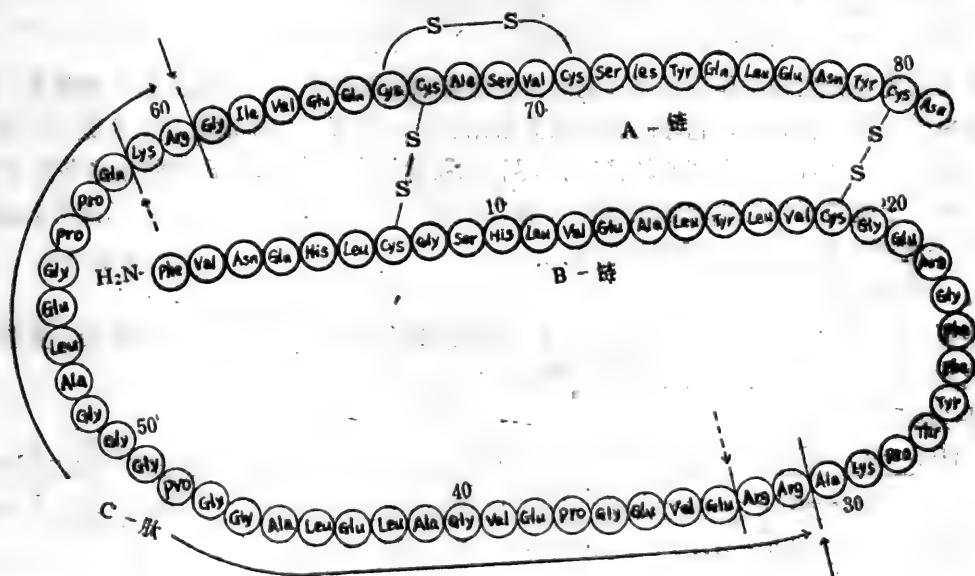


图7—13 牛胰胰岛素原的一级结构

肽链，分子内含有三个链内二硫键，可以看作是由一条连接肽（C-肽）将胰岛素的A、B两条链连接而成的。胰岛素原在粗糙内质网上合成之后，便转移到高尔基器，并在那里经类似

胰蛋白酶以及羧肽酶B那样的特异酶降解除去C-肽,即可转变成有活性的胰岛素。

产生胰岛素的mRNA在细胞蛋白质合成系统中的表达产物是一个比胰岛素原更大的分子,即在胰岛素原的N-末端还连接有一段富含碱性氨基酸的23肽(称“信号”肽),该分子称作前胰岛素原(Preproinsulin)。前胰岛素原经专一性酶水解除去“信号”肽后即转变成胰岛素原。

胰岛素的主要生理作用是降低血液中的葡萄糖的浓度。血糖的降低是由于胰岛素一方面提高组织摄取葡萄糖的能力,另一方面抑制肝糖元的分解,并促进肝糖元和肌糖元的合成。胰岛素的这种效应称为“低血糖效应”。胰岛素分泌的速度主要取决于血液中葡萄糖的浓度。当血糖浓度升高时,胰岛素的分泌速度增高。胰岛素水平的增高就加快葡萄糖从血液进入到肝脏和肌肉细胞中,并在那里被磷酸化,进而转变成糖元或被氧化,其结果导致血糖浓度降低到正常水平。当血糖恢复到正常浓度时,胰岛素的分泌又降低到正常的速度。所以,在胰岛素的分泌和血糖浓度之间有一种密切的反馈调节关系。

糖尿病患者因胰岛细胞受到损害,胰岛素分泌显著减少,血中的葡萄糖量大大超过正常标准,结果导致大量的葡萄糖随尿排出。但是,若胰岛机能亢进,胰岛素分泌过多,则会导致低血糖现象,能量供应不足,甚至会影响大脑的机能。

胰岛素亦能影响脂类代谢。在体内,胰岛素能促进肝脏和肝外组织由糖变成脂肪。在肝脏中,它还能促进低密度脂蛋白的合成。

有实验证明胰岛素能大大增加氨基酸参入到蛋白质中去的速度。它还能促进肽链合成的起始,这反映在核糖体同mRNA的亲力的增加。胰岛素还有加速RNA和DNA合成的能力,因而有促进细胞增殖的效应和促进生长的作用。

胰岛素对细胞功能还有其他方面的影响。

胰岛素的各种生物学作用是通过它同其受体蛋白结合后引发的。胰岛素的受体是一种特殊的蛋白质,含有糖成分,它能同胰岛素紧密结合。胰岛素受体在细胞表面的数目的改变取决于代谢状况,并且有相当高的转换率。尽管以前就有人认为cGMP可能是胰岛素的胞内信使,但关于胰岛素作用的细胞质信使(第二信使)仍然不清楚。然而业已证明细胞内的 Ca^{++} 对于激发胰岛素的作用是很重要的。

2. 胰高血糖素

胰高血糖素(Glucagon)是由胰岛 α -细胞分泌的一种多肽激素,它是由29个氨基酸残基构成的单一多肽链,分子量为3700(图7-14)。

N-末端

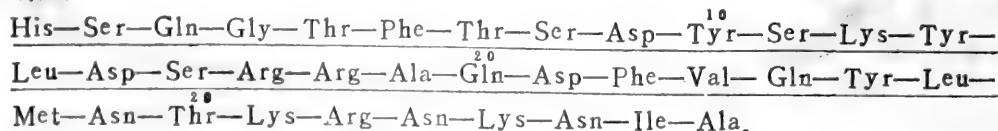


图7-14 胰高血糖素(划线部分)和它的前体的一级结构

C-末端。

近年来的研究表明,胰高血糖素象胰岛素一样,有两种无活性的前体,即胰高血糖素原和前胰高血糖素原。后者在胰高血糖素原的N-末端还有一段“信号”肽。经过两个加工过程即可产生有活性的胰高血糖素。

胰高血糖主要的生理作用与胰岛素相反，它具有升高血糖浓度的功能。这两种激素交互作用以控制血糖的浓度。

胰高血糖素的高血糖效应是通过两个不同的过程实现的。第一，胰高血糖素引起肝糖元的降解，从而升高血中葡萄糖的浓度，这与肾上腺素的作用机制相雷同。肝细胞质膜表面含有胰高血糖素的专一受体。当胰高血糖素与受体结合后，质膜上的腺苷酸环化酶被激活，接着便产生一系列级联放大作用（图7-18）。第二，胰高血糖素抑制葡萄糖降解成乳酸。这一点与肾上腺素的作用不同。这种抑制作用是通过糖酵解中磷酸果糖激酶的磷酸化而失活、降低果糖-2,6-二磷酸（磷酸果糖激酶的激活剂）的水平、以及丙酮酸激酶的肝脏型同工酶的间接抑制作用引起的，从而促进葡萄糖的异生作用。

胰高血糖素亦能促进脂肪的分解和蛋白质的降解。此外，胰高血糖素还有加强心肌收缩力的作用。还能促进胰岛 β -细胞分泌胰岛素。

胰高血糖素的分泌象胰岛素一样也受血糖浓度的控制。当血糖浓度低于50毫克/100毫升时，便刺激胰高血糖素的分泌；而当血糖浓度超过130毫克/100毫升时，则抑制胰高血糖素的分泌。

图7-2. 生长激素抑制素

生长激素抑制素（Somatostatin）是一种由14个氨基酸残基构成的多肽激素，它首先是作为下丘脑激素而被分离和鉴定的。生长激素抑制素是生长激素和其他垂体前叶激素分泌的抑制因子。其后，生长激素抑制素也在胰脏以及胃和内粘膜中分离出来。在胰脏中，生长激素首先是以其前体形式合成出来的，然后通过类似其他多肽激素的前体的加工过程，最终形成生长激素抑制素。生长激素抑制素是胰岛素和胰高血糖素的有效抑制剂。

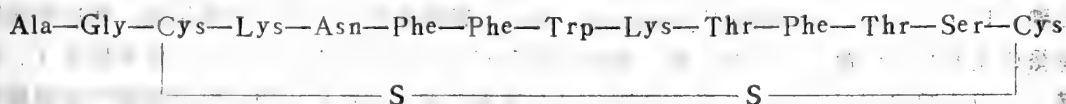


图7-15 生长激素抑制素的一级结构

四、调钙激素

调节钙、磷代谢的激素主要有甲状旁腺激素、降钙素，以及1,25-二羟维生素 D_3 。

1. 降钙素

降钙素（Calcitonin）是由甲状腺和甲状旁腺的滤泡旁细胞分泌的一种多肽激素。它由32个氨基酸残基组成，分子量为3500。不同来源的降钙素在结构上有些不同。

降钙素主要通过骨的作用降低血清中 Ca^{2+} 和无机磷酸的浓度。该激素通过抑制骨的吸收（溶解）发挥它的控制血清中 Ca^{2+} 的浓度的作用，从而减少骨的 Ca^{2+} 和无机磷的损失。这种减少是通过降低碱性磷酸酶和焦磷酸酶的产生以及降低尿中羟脯氨酸的排泄来完成的。

2. 甲状旁腺激素

甲状旁腺激素（Parathyroid hormone）是由甲状旁腺主细胞（Chief cells）分泌的。来自牛、猪和人的甲状旁腺的甲状旁腺激素都是由84个氨基酸残基构成的单一多肽链，它们的氨基酸顺序都已测定。

甲状旁腺激素主要的作用是调节钙、磷的代谢。它能促进骨质的溶解以及促进小肠对钙

的吸收和肾小管对钙的重新吸收,减少钙的排出,从而能使血清中 Ca^{++} 升高。它也能减少肾小管对磷的重吸收,使尿磷排出量增高,从而使血清中磷量减少。

由于上述两种激素都作用于骨和肾,共同对钙、磷的代谢进行调节,因而使血清中钙和磷的浓度保持相对稳定。

第四节 氨基酸衍生物激素

一、甲状腺激素

甲状腺分泌两种氨基酸衍生物激素,甲状腺素(Thyroxine, T_4)和三碘甲状腺原氨酸(Triiodothyronine, T_3)。这两种化合物的合成首先是通过甲状腺球蛋白的酪氨酸残基的转录后的碘化作用,然后经蛋白水解酶水解而形成的。甲状腺球蛋白是一种糖蛋白,含有两个相同的亚基,分子量为660,000,每分子甲状腺球蛋白含有140个酪氨酸残基,但是大约只有25个残基被碘化。

甲状腺激素的合成包括下面几个过程:①碘进入到甲状腺中;②碘转移到甲状腺球蛋白的酪氨酸残基上;③含碘的甲状腺球蛋白经蛋白水解作用,产生甲状腺激素,并将其释放到血液中。

甲状腺具有很强的吸收碘和浓缩碘的能力。被摄入的碘进入到甲状腺滤泡的胶质中。甲状腺所含的碘高出血浆25—40倍。碘是通过一种活性转运机制而摄入的。该过程是一种耗能过程。甲状腺球蛋白的碘化由甲状腺过氧化物酶催化。该酶是一种血红素蛋白,并对 H_2O_2 绝对需要。碘在取代酪氨酸芳香环上的氢以前必需被活化。碘的酶促氧化机制仍未确定。活化碘(I^+)与肽链上的酪氨酸残基起反应,生成二碘酪氨酸和少量单碘酪氨酸。然后甲状腺球蛋白上的两个位置适合的碘化酪氨酸残基偶联(过氧化物酶也能催化这一偶联反应)。被碘化的甲状腺球蛋白不具有激素的性质,仅在该蛋白被水解释放出碘化酪氨酸即甲状腺激素后才显示出激素的性质。催化碘化甲状腺球蛋白水解的酶是由甲状腺滤泡上皮细胞内的蛋白水解酶完成的。甲状腺激素的形成过程如图7—16所示。

正常人每日大约产生70—90微克的甲状腺素(T_4)和35微克的三碘甲状腺原氨酸(T_3)。但是大约75—80%的 T_3 是在周围组织中由 T_4 转变而来的。

甲状腺激素的产生受下丘脑分泌的激素控制。下丘脑分泌的促甲状腺激素释放激素(TRH)刺激垂体前叶分泌促甲状腺激素并进入血液。促甲状腺激素同甲状腺细胞膜上的受体结合,刺激甲状腺产生甲状腺激素。

甲状腺激素通过血液把它们运送到靶组织,除成熟的大脑和再生组织等少数组织外,大多数组织都会受到甲状腺激素的刺激,尤其在刺激肝脏和肌肉的代谢中特别活跃。

甲状腺激素能自由通过细胞质膜。甲状腺激素的受体位于对它们敏感的细胞的核内,这与甾醇类激素的受体不同,甾醇类激素的受体位于细胞质中。甲状腺激素同受体的结合具有高度的专一性和很高的亲和力。通过甲状腺激素—受体复合物与特定基因的相互作用,诱导靶细胞大量合成某些酶和酶系统。其主要的结果是刺激基础代谢速率,促进生长。

尽管有许多研究,但甲状腺激素究竟是怎样调节需氧代谢的速度仍然是个谜。虽然线粒体是组织呼吸和ATP形成的场所,但甲状腺激素如何影响线粒体的活性仍然不清楚。

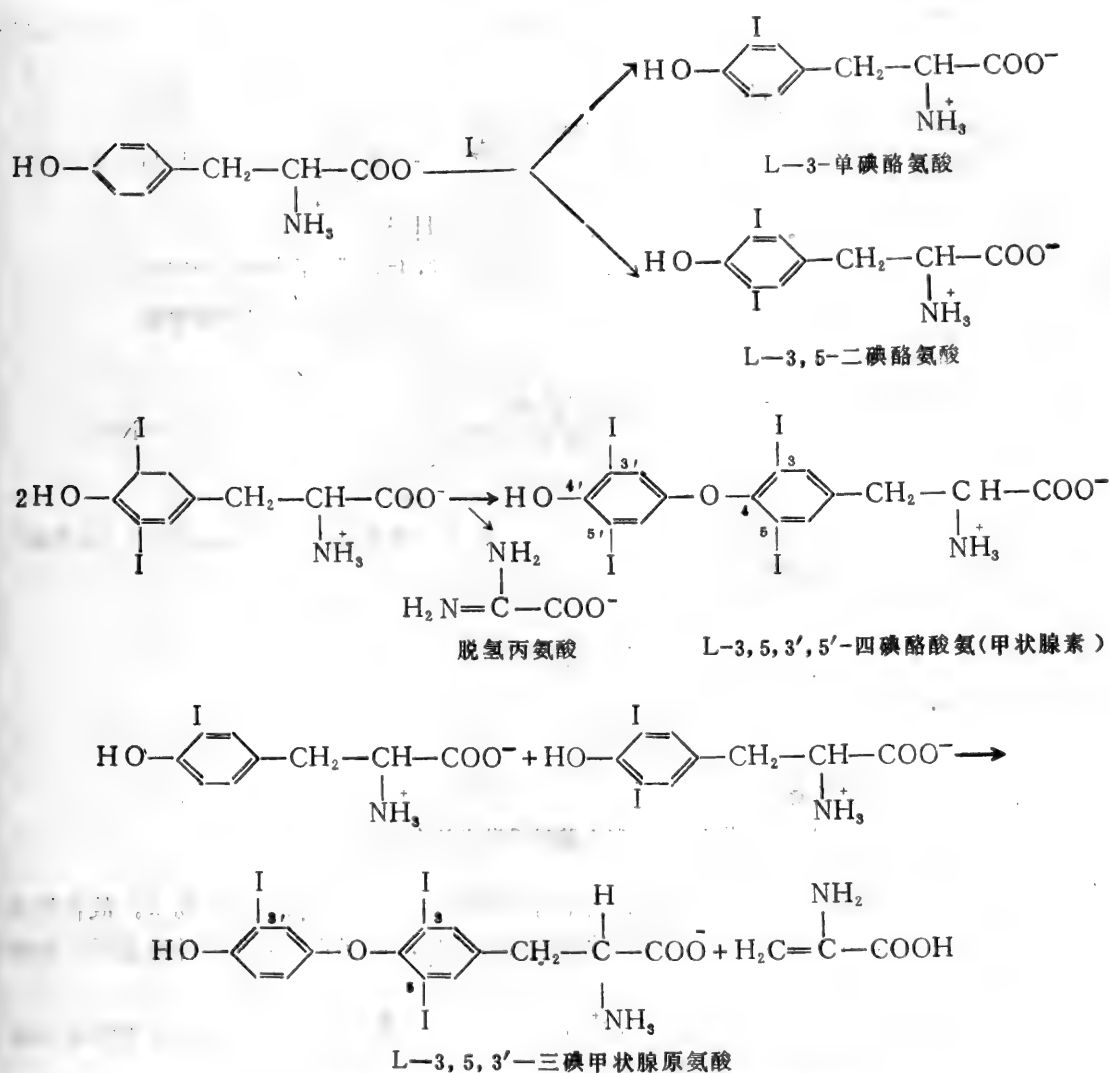


图7-16 甲状腺激素合成过程（这些反应都发生在甲状腺球蛋白上）

人的甲状腺机能必须保持正常才能维持健康。若甲状腺机能亢进，甲状腺激素分泌过多，则会导致基础代谢速度高于正常标准。患者身体消瘦，神经紧张，心跳加快，眼球凸出。若在幼年，甲状腺激素分泌不足，则骨骼生长和大脑发育障碍，以致身体矮小，智力低下，称为“呆小症”，若成年人甲状腺激素分泌不足，则基础代谢率低于正常，过多的蛋白质在组织间隙中积存，妨碍细胞间液流回血液。患者皮下浮肿，记忆力和性机能减退。

二、肾上腺皮质激素

肾上腺由两种结构组成，即肾上腺髓质和肾上腺皮质，这两种结构的激素产物在它们的作用方面是不同的。肾上腺髓质产生和分泌两种激素——肾上腺素（Adrenaline 或 Epinephrine）和去甲肾上腺素（Noradrenaline 或 Norepinephrine）。

肾上腺素和去甲肾上腺素是水溶性的，是由酪氨酸衍生而来的（图7—17），其中间物

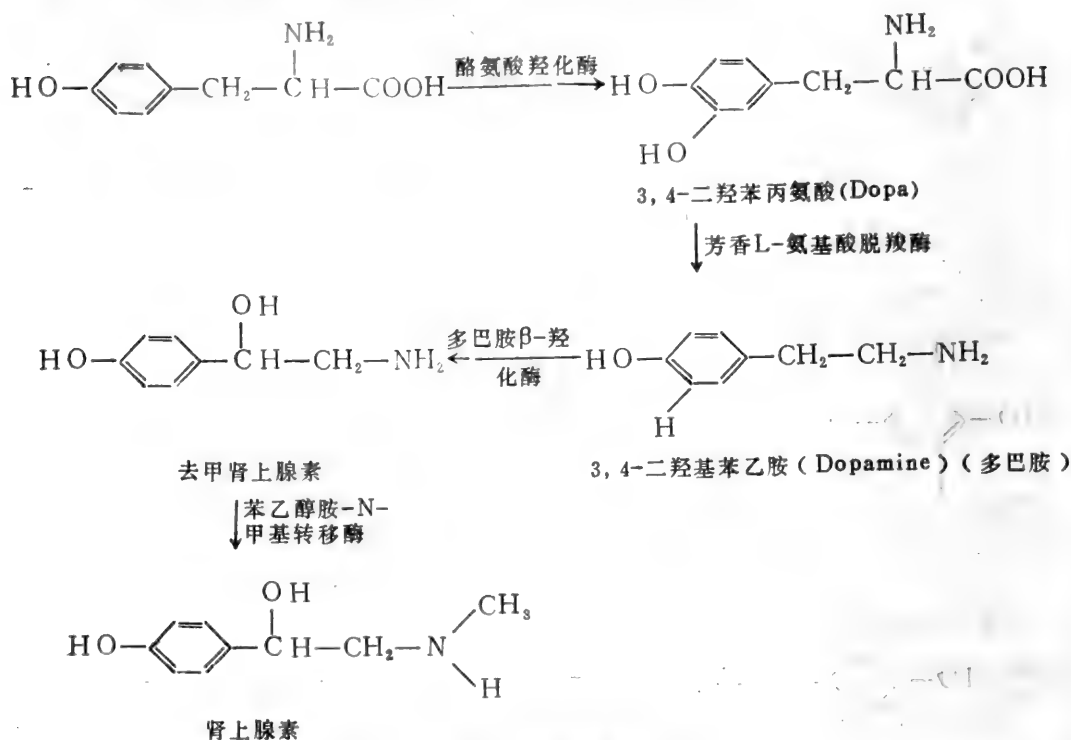


图7—17 肾上腺髓质激素的合成

多巴胺也具有激素活性。由于肾上腺素、去甲肾上腺素和多巴胺都含有儿茶酚基，故它们又称儿茶酚胺类激素。儿茶酚胺也可在脑和神经系统中产生，在那儿它们作为神经递质而起作用。

肾上腺素和去甲肾上腺素具有广泛的生理作用。这两种激素的许多作用都是相同或相似的，它们的差异只是量上的而不是质上的。

肾上腺素对心脏和血管都作用。它能加速心率、增高心输出量，能引起动脉收缩，从而升高血压。去甲肾上腺素对心脏的兴奋程度比肾上腺素弱，但能使除冠状动脉以外的全身小动脉收缩，故有较强的升高血压的作用。

肾上腺素对糖代谢有很大的影响。它在这方面的作用与胰高血糖素相似，但与胰岛素的作用相拮抗。肾上腺素能刺激肝糖元的降解，从而增高血液中葡萄糖的浓度。它也能刺激肌糖元降解，促使肌糖元经酵解过程转变成乳酸，从而可使血液中乳酸量升高。在此过程中可发生底物水平磷酸化生成ATP。

去甲肾上腺素亦有上述作用，但较弱。

肾上腺素的作用机制是研究得比较清楚的。关于激素作用的第二信使学说的研究首先就是从肾上腺素如何促进肝糖元分解开始的（见本章第二节）。

当动物需要付出大运动量时，在中枢神经系统的支配下，肾上腺素的分泌大大增加，几乎增加上千倍。肾上腺素作为第一信使随着毛细血管血流到达靶细胞肝细胞上，与肝细胞膜

上的受体结合，并激活膜上的腺苷酸环化酶，从而使胞质中的ATP转变成为 cAMP。胞质中的 cAMP 浓度升高便产生一系列级联放大作用，最终导致肝糖元的分解，血糖浓度升高。血液中葡萄糖随循环血液输送到各组织，供细胞分解产生能量。

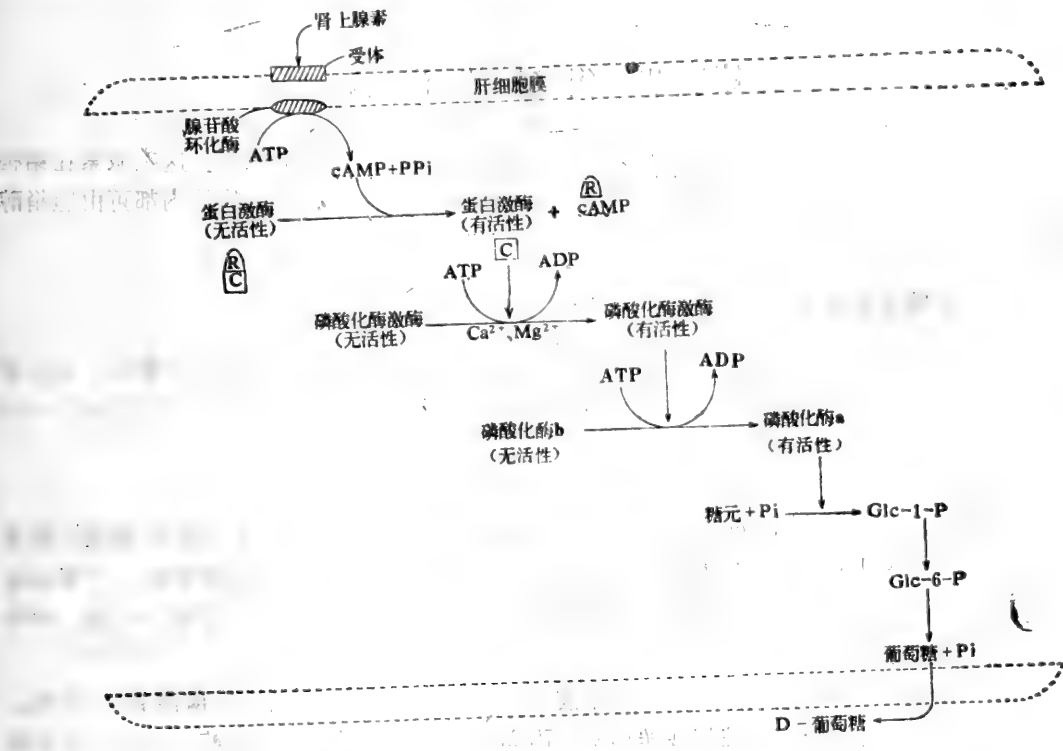


图7—18 肾上腺素促进肝糖元降解的机制

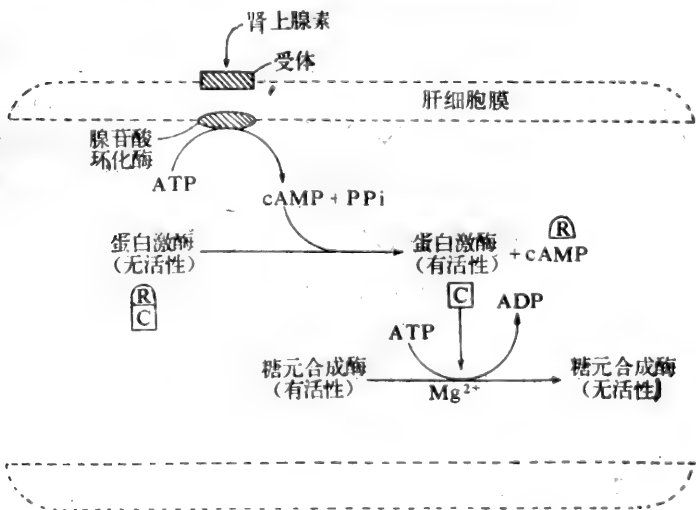


图7—19 肾上腺素抑制肝糖元合成的机制

肾上腺素不仅促进肝糖元分解，而且还能抑制肝糖元的合成。肾上腺素对糖代谢影响的这两方面的作用可用图7—18和图7—19表示。

肾上腺素除上述作用外，还能促进蛋白质分解，促进脂肪水解和脂酸氧化，使血和尿中的酮体升高。

第五节 甾醇类激素

肾上腺皮质激素、雄激素和雌激素是一类主要的脂溶性的甾醇类激素。这类激素在结构上有很大的相似性，其化学本质均可视为环戊烷多氢菲的衍生物，在动物体内都可由胆固醇转变而成。

一、肾上腺皮质激素

肾上腺皮质至少能产生约50种甾醇类物质。这些甾醇类物质主要是糖皮质激素、盐皮质激素以及一些性激素。性激素主要是在性腺中产生。肾上腺皮质激素的生物合成如图7—20所示。

1. 糖皮质激素

糖皮质激素 (Glucocorticoids) 因它们影响糖代谢而得名。其中最重要的糖皮质激素是皮质醇 (Cortisol)。这类激素的主要生理功能是能够促进肝脏释放出葡萄糖，升高血糖的浓度；促进糖元生成以及由生糖氨基酸合成糖的异生作用，导致糖元在肝脏中积累，并降低葡萄糖的氧化利用。

升高血液中葡萄糖的浓度的原因是由于皮质醇能增高肝脏型葡萄糖-6-磷酸酶的活性。此外，皮质醇能增高特异的肝脏氨基转移酶、丙酮酸羧化酶以及糖元合成酶的活性，这些酶都有助于肝糖元的储存。

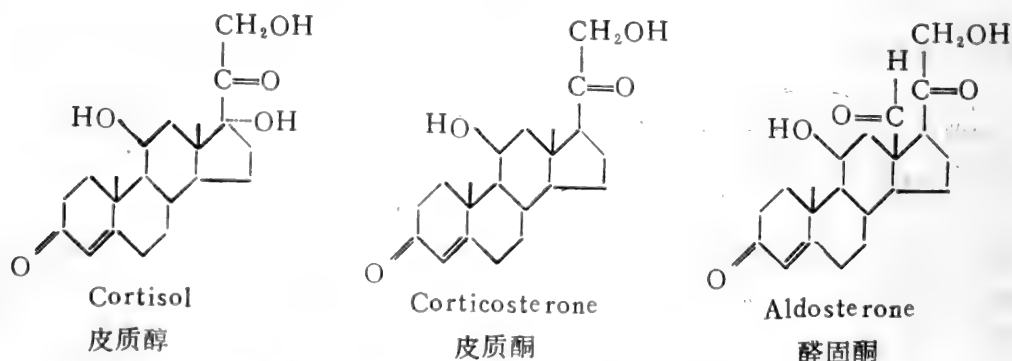


图7—22 几种主要的肾上腺皮质激素的结构

糖皮质激素能够促进脂肪组织释放出游离的脂酸；也能促进其他脂解因子如肾上腺素或胰高血糖素的作用，从而导致原生质游离脂酸水平的升高。这种动用脂类的作用可以导致酮体的生成。糖皮质激素的上述作用可能反映出葡萄糖利用受阻，减少了脂肪生成所需要的甘油。这类激素在提高其他脂解激素作用方面的影响也许是由于提高了细胞对 cAMP 的敏感

性。

糖皮质激素亦能影响蛋白质和核酸的代谢。糖皮质激素也还具有抗炎症及抗变态等作用。

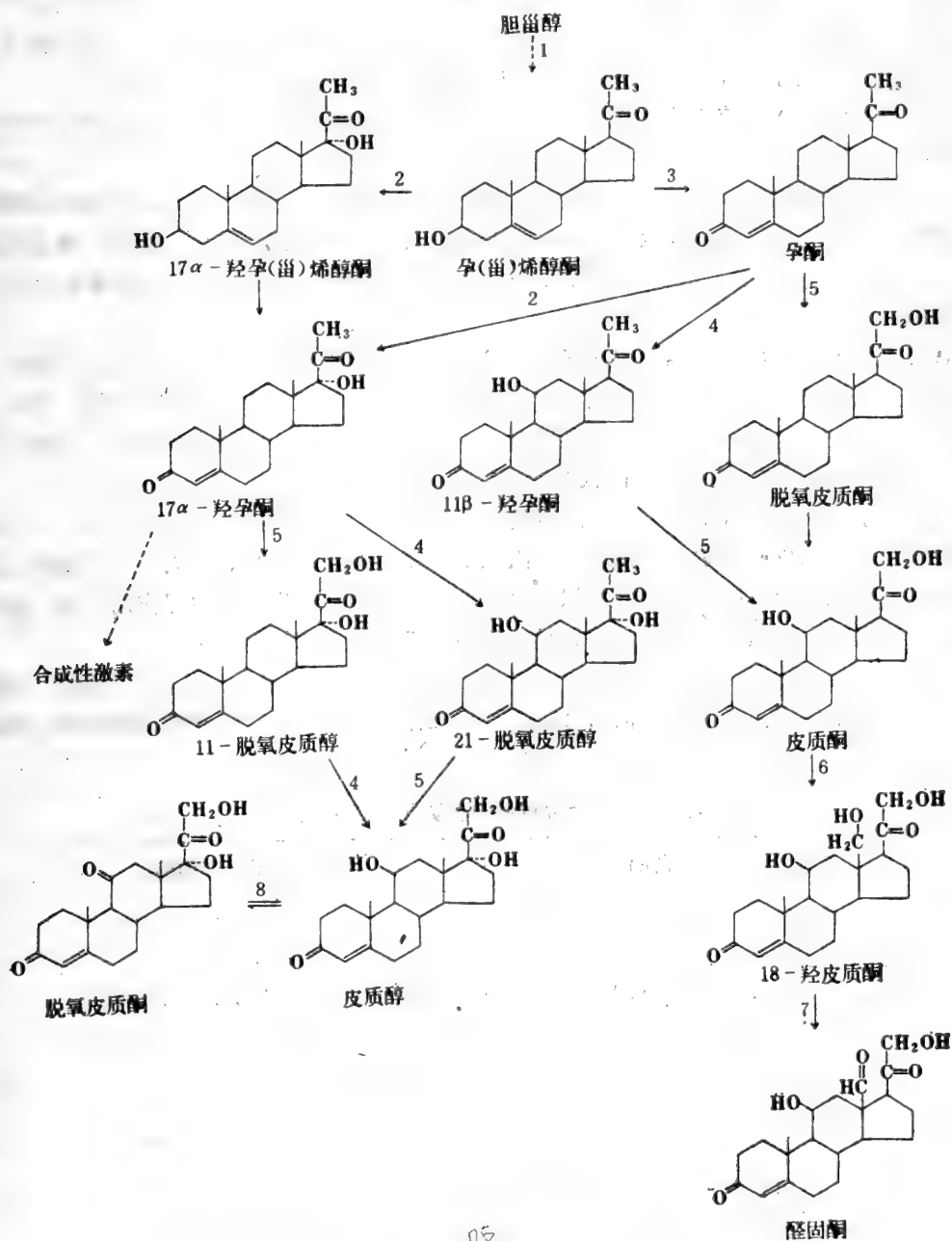


图7-21 肾上腺皮质激素的合成

①20, 22-碳链裂解酶复合物；②17 α -羟化酶；③3 β -羟甾类脱氢酶- $\Delta^4,5$ -异构酶；

④11 β -羟化酶；⑤21-羟化酶；⑥18-羟化酶；⑦18-羟甾类脱氢酶；⑧11-羟甾类脱氢酶。

2. 盐皮质激素

肾上腺皮质产生的另一类主要激素是盐皮质激素 (Mineralocorticoids)。这类激素的主要生理作用是调节水、盐的代谢。它们具有保留钠 (Na⁺) 而排出钾 (K⁺) 的作用。这种作用是通过肾小管对钠的重吸收和排钾来完成的。通过这种作用，它们可以维持身体中水、盐的平衡。醛固酮 (Aldosterone) 是这类激素中生理活性最强的。此外，盐皮质激素亦具有较弱的糖皮质激素活性；相反，糖皮质激素亦具有弱的盐皮质激素的活性。

还有一些肾上腺皮质激素的作用兼有上述两类激素的特征。这类激素最主要的有皮质酮 (Corticosterone)。

肾上腺皮质激素的分泌受下丘脑控制。当受到刺激时，下丘脑分泌促肾上腺皮质激素释放激素。促肾上腺皮质激素释放激素被送到垂体前叶，并刺激它释放出促肾上腺皮质激素 (ACTH)。ACTH 经血液到达靶组织肾上腺皮质的细胞表面，与特定的受体结合，刺激皮质细胞产生皮质激素。

若肾上腺 (糖) 皮质激素分泌过多，则会产生“柯兴氏”症，患者疲劳、血量增加、血压升高，并出现高血糖、低血钾现象，可因体内保留钠和水超过限度而导致水肿。若肾上腺皮质激素分泌不足，则会引起“阿狄森”症，患者疲劳、虚弱、皮肤色素沉着、血糖降低、血浆中 K⁺ 增高而 Na⁺ 减少、新陈代谢速率降低。

糖皮质激素和盐皮质激素通过未知的机制进入到它们的靶细胞内，并与它们各自专一的细胞质受体结合。糖皮质激素的受体在许多组织都存在，例如肝、肾、肌肉、骨、皮肤、脂肪细胞、淋巴组织、肺、脑以及其他组织。这与糖皮质激素具有广泛的生理作用一致。盐皮质激素的受体只在少数组织中发现，例如肾、结肠粘膜、唾液腺管等组织。

甾体激素与受体结合诱导受体的构象发生变化，这个过程叫激活，从而促进激素-受体复合物同核内的染色质上的接受部位结合。这种相互作用导致 RNA 聚合酶活性增高和特定基

表7—7 肾上腺皮质激素诱导合成的某些酶

糖皮质激素诱导的酶	盐皮质激素诱导的酶
色氨酸-2, 3-二加氧酶	柠檬酸合成酶
酪氨酸氨基转移酶	谷氨酸脱氢酶
磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶	谷-草转氨酶
3-磷酸甘油醛脱氢酶	
葡萄糖-6-磷酸酶	
丙酮酸羧化酶	
果糖-1, 6-二磷酸酶	
糖元合成酶	
苯乙醇胺-N-甲基转移酶	
谷氨酰胺合成酶	
精氨酸合成酶	
精氨(基)琥珀酸裂解酶	
精氨酸酶	

因的转录速度加快，从而提高特定蛋白质合成的速度。但是，应该强调，在任何特定细胞中，只有很少种类的蛋白的合成受到影响。表7—7列举了一些受上述皮质激素诱导而合成的酶。

二、性腺激素

性腺（雄性的睾丸和雌性的卵巢）象肾上腺皮质一样可以产生甾醇类激素——雄激素（Androgens）和雌激素（Estrogens）。肾上腺皮质、睾丸和卵巢都有共同的胚胎学起源。雄激素不仅由睾丸产生，而且在肾上腺皮质和卵巢中也有产生，雌激素不仅由卵巢产生，而且也能在肾上腺皮质和睾丸中产生。所有的甾醇类激素最终都是由一个共同的前体——胆固醇产生的（图7—21和图7—23）。最重要的性腺激素如图7—22所示。

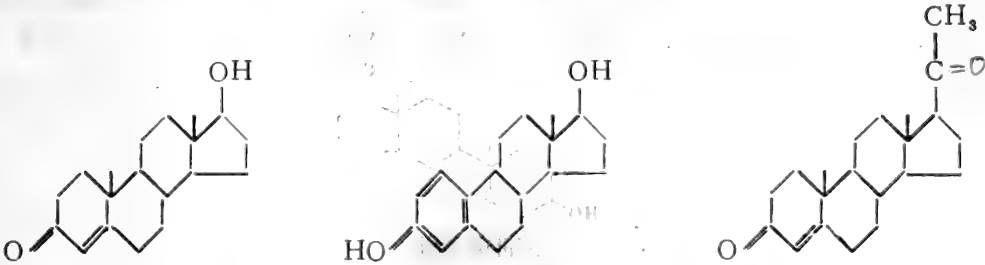


图7—22 主要性腺激素的结构

1. 雄激素

最主要的雄激素是睾酮 (Testosterone)。睾酮的转化产物二氢睾酮具有很强的激素活性，除睾酮和二氢睾酮外，还有雄酮和雄烯二酮，但这两种雄激素的生理活性很弱，它们是睾酮的代谢产物。

雄激素的生理作用主要有：①在胚胎发育期调节男性表型的分化；②青春期男性第二性征的发育和维持；③促进和维持精子的产生；④促进蛋白质的合成和生长；⑤影响性行为；⑥调节促性腺激素的分泌。

2. 雌激素和孕酮

卵巢的主要生殖和内分泌单位是卵泡（或称滤泡，Follicles），每个卵泡由两层细胞带包围着一个卵细胞所构成。里层的粒细胞是雌激素的主要来源。外层含膜细胞（Theca cell），主要受腺垂体促黄体生成激素（LH）的调节。膜细胞合成雌激素的前体，前体可被粒细胞利用合成雌激素。在成熟的卵泡排卵之后，在LH的刺激下，卵泡粒细胞变成黄体细胞，黄体细胞分泌孕酮。

主要的雌激素是雌二醇（又称激动素），它的激素作用最强。此外还有雌三醇和雌酮，它们的激素作用比雌二醇弱得多，是雌二醇的代谢产物。

雌激素的主要功能有：促进雌性动物的性器官的发育，使子宫内膜增生和阴道上皮增厚；引起动物动情，发生性欲；促进和维持第二性征，例如乳腺的发育和产生月经等；影响腺垂体促性腺激素的分泌。此外，雌激素还能影响脂及脂蛋白代谢。

孕酮是黄体细胞分泌的激素，又称黄体酮或妊娠素。它的主要作用是促进子宫及乳腺的发育，帮助受精卵着床及胚胎正常发育，抑制排卵，停止月经，抑制动情及减少子宫收缩等

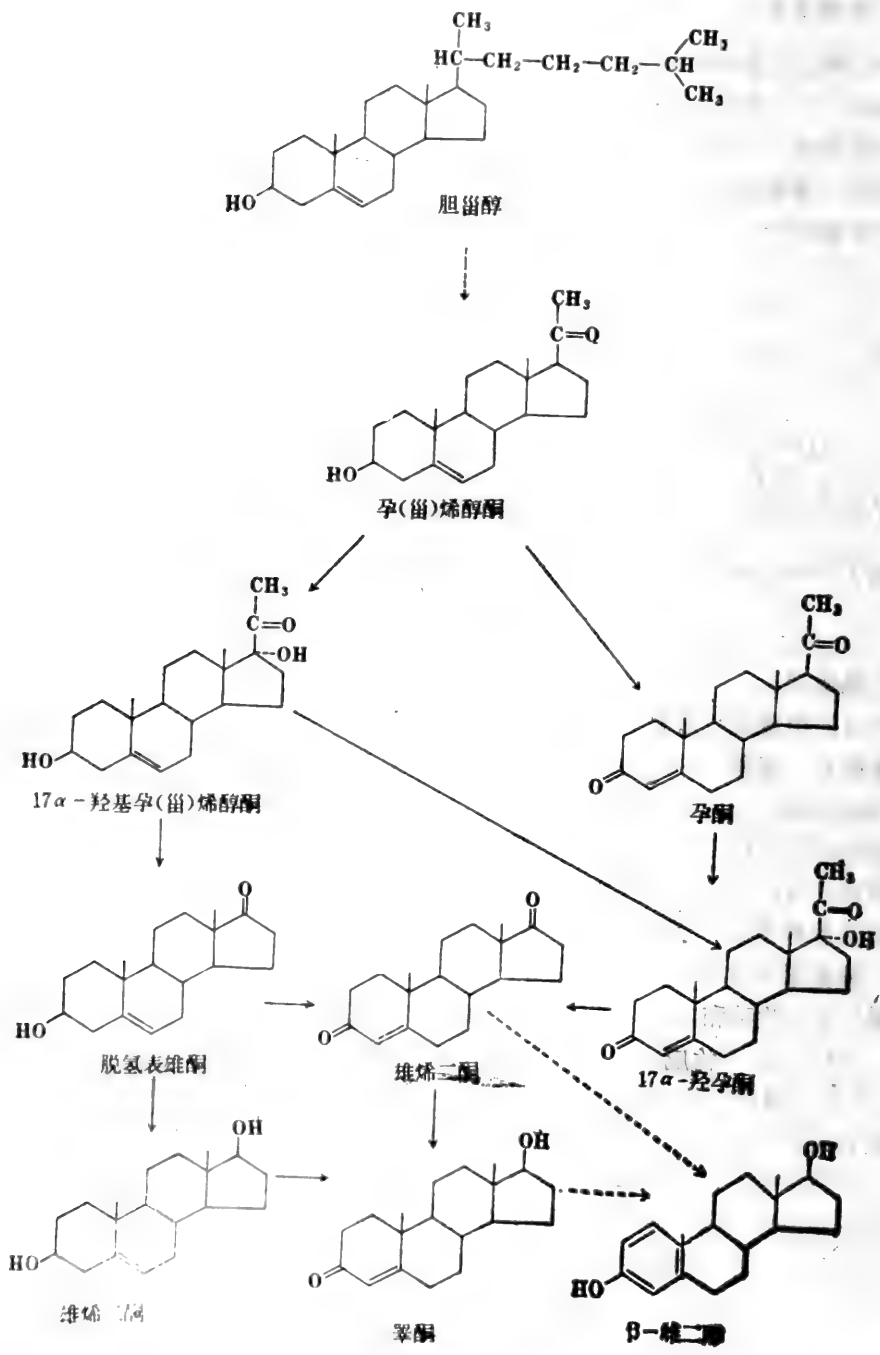


图2-23 性激素的合成途径

作用。

关于性激素分泌的调节以及它们的作用机制见本章第二节和第三节有关内容。

第六节 前列腺素

前列腺素 (Prostaglandins, 简称 PG) 是一类和激素具有相似作用的脂肪酸 衍生物的总称。其实, 前列腺素并不是由前列腺产生和分泌的, 而首先是从分泌精液的精液腺中提得的, 只不过是一种误称吧了。除精液腺能产生和分泌这类物质以外, 还有许多 其他组织如脑、肺、胰、腺、子宫、胸腺、胃等都能产生和分泌这类物质。

前列腺素是廿碳不饱和脂肪酸的衍生物, 其基本结构是含有一个五元环的前列腺酸。现已发现的前列腺素至少有20多种, 根据五元环上的取代基和双键的位置不同可分为 PGA、PGB、PGC、PGD、PGE、PGF、PGG、PGH 和 PGI 等类型; 根据侧链上双键的数目的多少又可进一步分为: PGX_1 、 PGX_2 、 PGX_3 等 (X 代表 A、B 或 C、……)。其中主要的两类是 PGE 和 PGF。

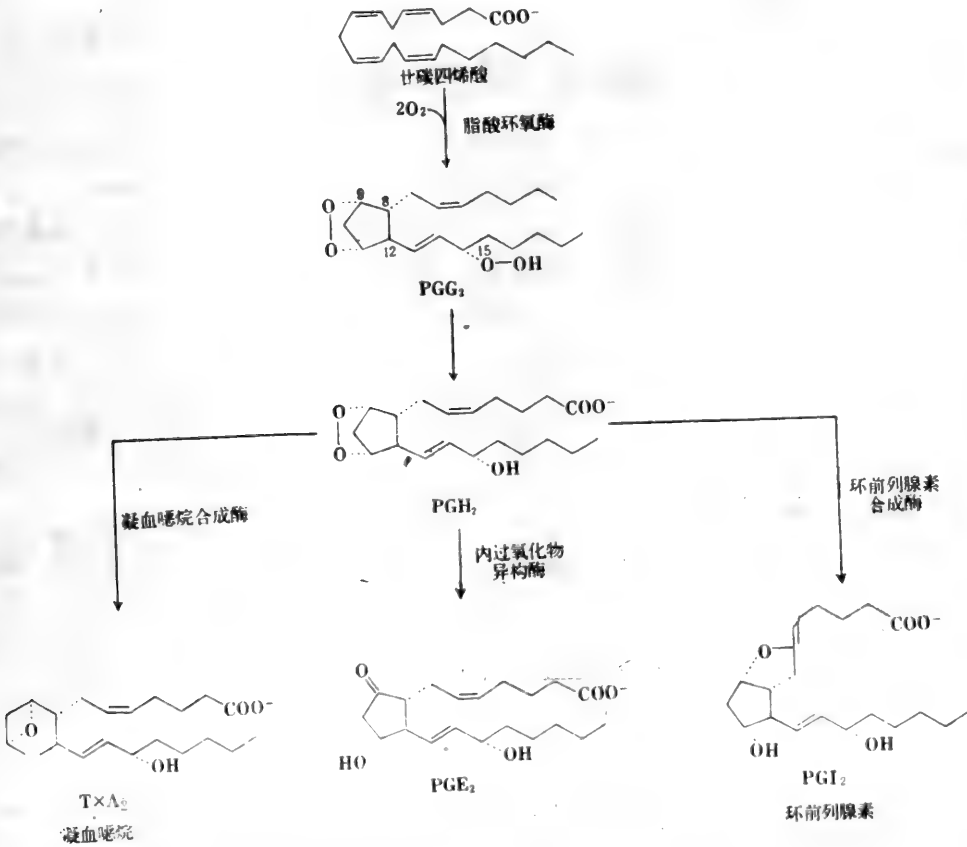


图7-24 三种前列腺素的合成

三种不同类型的前列腺素的合成过程如图 7-24 所示。第一步反应是脂酸环氧酶 (Fatty

acid cyclo—oxygenase)催化,即把一个氧分子加到廿碳四烯酸的 C_9 和 C_{15} 上,并在 C_8 和 C_{12} 之间形成键,从而形成一个五元环。第二步反应是过氧化氢酶催化的。上述两种酶构成内过氧化物合成酶复合物。虽然所有产生前列腺素的组织中都有这种酶复合物,但所合成的 PGH_2 的生化去向却受组织特异的酶决定。例如,在产生 PGE_2 的某个组织中,存在内过氧化物异构酶,能把 PGH_2 转变成 PGE_2 。

前列腺素是人体中分布最广、效应最大的生物活性物质之一,而且同一种前列腺素在不同组织中的作用不同,同一种组织对不同的前列腺素反应也不相同。例如, PGE_1 、 PGE_2 、 $PGE_2\alpha$ 有刺激胃肠道和子宫平滑肌收缩的作用,在临床上已成功地用于引产; PGE_1 和 PGE_2 有松弛支气管平滑肌的作用,但 $PGF_2\alpha$ 却有相反的作用。又例如 PGE_1 对血小板聚集有明显抑制作用,而 PGE_2 却有促进血小板聚集的作用。 PGE 和 PGA 是有效的血管扩张剂,静脉注射 PGA 或 PGE 可降低血压,有希望用于治疗高血压。

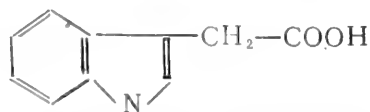
前列腺素作为细胞功能的局部调节剂,可以对许多内分泌腺分泌激素进行调节。例如,前列腺素的刺激可促进甲状腺、肾上腺皮质、卵巢和甲状旁腺等腺体分泌激素。另外,通过前列腺素对腺苷酸环化酶的影响,可以调节许多激素的作用。这样就可以部分地解释前列腺素作用的广泛性和多样性。

第七节 植物激素

植物激素(或称植物生长因子)调节植物的生长和发育。迄今为止,所发现的主要的植物激素可分为五种类型:植物生长素(auxins)、细胞分裂素(cytokinins)、赤霉素(gibberellins)、脱落酸(abscisic acid)和乙烯(ethylene)。但是,与动物激素不同,在某些种类的激素中存在许多不同的天然化合物,它们都具有激素的活性。例如,目前已经发现了六十多种赤霉素。所有已鉴定好的植物激素都是低分子量的化合物。虽然在低等植物和真菌中,某些偶配因子是多肽,但在高等植物体内尚未发现多肽激素。每一种类型的化合物都可以引出各种各样的反应。在控制生理过程中,不同激素之间有相当的联系。而且,不同植物种类的同一过程可受不同的激素控制。因此很难归纳出植物激素作用的机制。

一、植物生长素

植物生长素是由生长着的幼苗顶端芽中的色氨酸转变而成的。在高等植物中最普遍存在的植物生长素是吲哚乙酸,它具有类似色氨酸的结构:

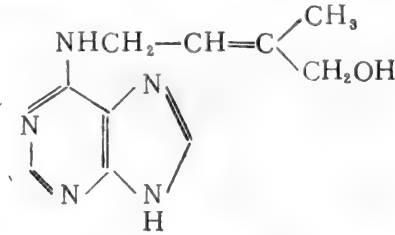


植物生长素刺激主苗的生长,抑制侧苗的发育。植物生长素可以同一种分子量约40,000的膜蛋白结合,该蛋白很可能是这类激素的受体。植物生长素刺激细胞生长可分为两期。首先是增高质子从细胞内向外转移,降低胞外 pH,从而刺激能部分降解细胞壁的那些酶,使细胞壁松开并允许细胞伸长。其次,植物生长素能增加蛋白质和核酸的合成,导致继续生长。所

有植物生长素的作用都可被蛋白质合成抑制剂阻止。

二、细胞分裂素

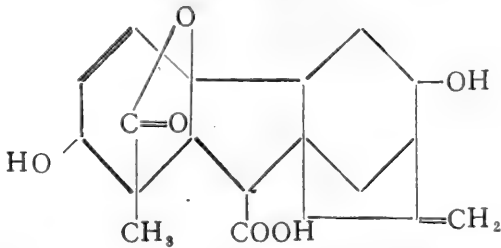
细胞分裂素（或称细胞激动素）是腺嘌呤的衍生物，其由植物根产生。



细胞分裂素可引起许多组织的生长和分化，能克服植物生长素对侧苗的抑制作用。在许多组织中，这两种激素能协同作用。在植物细胞培养中，植物生长素和细胞分裂素两者的比例是很重要的。当植物生长素的比例偏高时，引发主苗的分化和生长；若细胞分裂素比例偏高，则引发根的分化和生长；若两者居间浓度则会引发未分化细胞的生长。

三、赤霉素

目前发现的赤霉素已超过60种，其结构都含有一个赤霉核。赤霉酸的结构如下所示：



五、乙烯

乙烯是由 S-腺苷甲硫氨酸合成的，乙烯通过改变植物生长素的运输方向，在横向上而不是在纵向上影响植物的生长。它也能刺激水果成熟和花的老化，并抑制籽苗的生长。

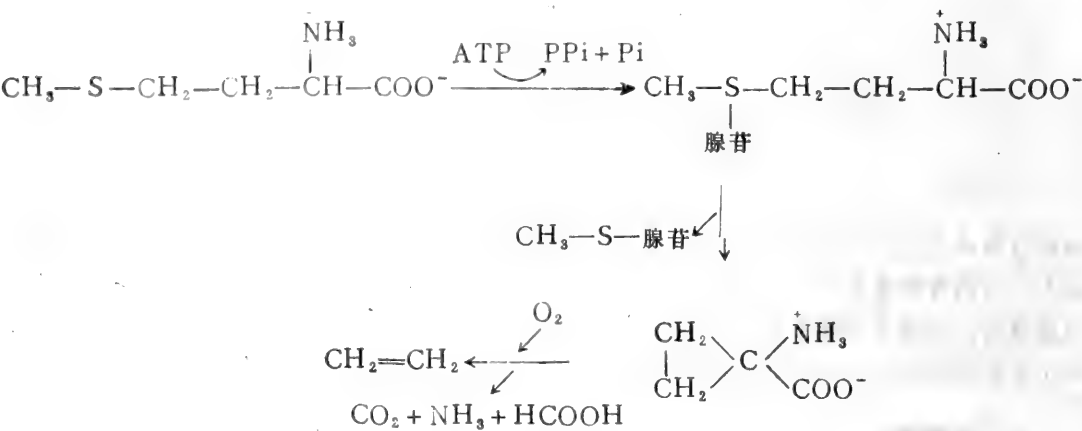


图7—25 植物中乙烯合成途径

第八章 生物氧化和生物能量学

生命和非生命的区别在于它经常地进行自我更新。生物体和外界进行物质交换是它存在的基本条件，是生物赖以生长、繁殖、运动的基础。生物体同外界的物质交换以及自我更新包含着各种化学变化。这些不同的化学变化在生物学上叫做新陈代谢 (metabolism)。

新陈代谢包括两个相反的过程。一方面，生物体从食物中摄取养料转换成自身的组成物质，并贮存能量。这个过程称为合成代谢 (或称为同化作用)。另一方面，生物体将自身的组成物质分解并释放能量，以供各种生命活动的需要，其最终产物则排出体外。这个过程叫做分解代谢 (或称为异化作用)。通过代谢，生物体同环境不断地进行物质交换和能量交换。代谢是酶所催化的反应，具有复杂的中间过程，例如葡萄糖在体内氧化成水和二氧化碳要经过许多化学变化。这些变化总称为中间代谢。新陈代谢失调会产生疾病，新陈代谢一旦停止，生命也就终止。

从本章开始，我们将介绍生物体内主要物质的分解代谢和合成代谢，物质代谢过程中的能量的产生和利用，以及代谢过程和途径的调节控制。

生物体的基本组成单位是细胞 (cell)。各种代谢反应一般都是发生在特定的组织或细胞中。因此，各种代谢反应都与细胞结构有着切密的关系。我们在介绍各种物质的代谢途径和化学变化过程时，也特别注意这一点。

第一节 生物氧化的基本概况

一、生物氧化的定义

一切生命运动都需要能量。能量的来源是糖、脂、蛋白质在体内的氧化作用产生的。糖、脂、蛋白质等有机物质在活细胞内氧化分解，产生二氧化碳和水并释放出能量的过程即称为生物氧化 (Biological oxidation)。

由于生物氧化是在细胞或组织中发生的，所以生物氧化又叫做细胞氧化 (Cellular oxidation) 或细胞呼吸 (Cellular respiration)，有时称为组织呼吸 (Tissue respiration)。

二、生物氧化的特点

生物氧化是发生在生物体内的氧化还原反应，它具有自然界物质发生氧化还原反应的共同特征，这主要表现在被氧化的物质总是失去电子，而被还原的物质总是得到电子，并且物质被氧化时，总伴随能量的释放。有机物在生物体内完全氧化和在体外燃烧而被彻底氧化，在化学本质上是基本相同的，最终的产物是 CO_2 和 H_2O ，并且释放出的能量总值也是相同的。例如一克分子的葡萄糖在体内氧化和在体外燃烧最终都是产生 CO_2 和 H_2O ，释放出的

总能量都是686千卡。这并不奇怪，因为氧化作用所释放出的能量等于这一物质所含的化学能与其氧化产物所含的化学能之差，放出总能量的多少与该物质氧化的途径无关，只要在氧化后所生成的产物相同，放出的总能量也必然相等。

但是，由于生物氧化是在活细胞内进行的，故它与有机物在体外燃烧有许多不同之处，也就是说，生物氧化有它本身的特点。

①有机物在空气中燃烧时， CO_2 和 H_2O 的生成是空气中氧直接与碳、氢原子结合的产物。而有机物在细胞中氧化时， CO_2 的生成并非是氧和碳的直接化合，而是有机物在代谢过程中经脱羧反应而释放出来的。 H_2O 的生成则是通过更复杂的过程完成的。

②有机物在生物体内的氧化还原反应是在一系列的酶的催化下进行的，所以生物氧化是在温和的条件下，即在恒温恒压下进行的反应。而有机物质在体外燃烧是在高温下进行的。

③由于酶在细胞内的催化反应受到细胞环境的影响并受到各种因素的调节，而且催化有机物氧化的各种酶在细胞内都具有特殊的定位关系。因此，有机物在体内氧化所产生的能量是逐步发生的、分次释放的。而有机物在体外燃烧所产生的能量是骤然放出的。

三、生物氧化的基本过程

生物氧化与物质代谢有着密切的关系。糖酵解、脂酸氧化、氨基酸的氧化分解、三羧酸循环等代谢过程是各有机物氧化分解所必经的途径。在这些代谢反应过程中，有机物在酶的催化下脱羧脱氢。不同的有机物所途径的分解过程虽不尽相同，但它们脱下的氢最终被氧化成水的过程是相同的。我们在本章介绍的主要内容之一就是这一段相同的过程。其他的内容将分散在有关章节中介绍。

由于水是生物氧化的最终产物之一，因此氧可能是一种受氢体。但是，许多实验表明，生物体内的脱氢酶所催化的反应，真正能够利用分子氧作为直接受氢体的甚少，而大多数经脱氢酶所催化的反应都是以生物体内比较复杂的有机物分子为直接受氢体，它们接受氢后依次传递。当传递到细胞色素 b 时，把氢质子释放到介质中（见呼吸链部分），电子再经细胞

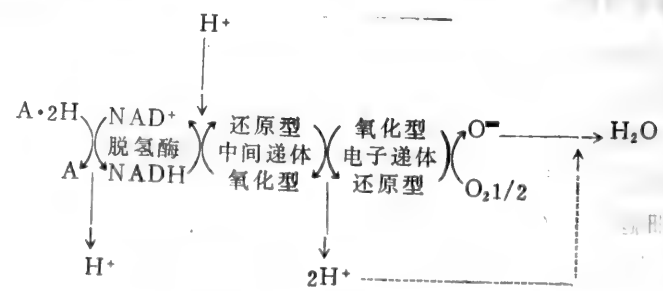


图8-1 水生成机制

$\text{A} \cdot 2\text{H}$ 表示底物的还原型，A 表示底物的氧化型

色素系统传递到分子氧，使氧激活 (O^-)。激活后的氧便与介质中的 H^+ 结合生成水。这一传递过程如图8-1所示。实际上，这些受氢体（或氢载体）上的氢原子以质子 (H^+) 的形式和周围环境中的氢质子进行交换，并混杂在一起，只是发生电子传递（或转移），电子在传递过程中有着严格的顺序。这一传递过程是由一系列的氧化还原反应所组成。氧化还原反

应中所释放的能量推动着腺嘌呤核苷三磷酸 (ATP) 的合成。ATP 是生物体内最重要的高能中间物, 参与体内众多的需能反应。

第二节 生物氧化中的能量问题

为了说明生物体内能量的产生和利用的问题, 有必要先介绍有关自由能的概念以及化学反应中的自由能的变化。

一、自由能的概念

自由能是一个化合物分子结构中所固有的能量, 是一种能在恒温恒压下做功能量。根据热力学原理, 自由能可由下式表示:

$$G = H - TS \quad (1)$$

这里 G 代表自由能; H 是热含量 (heat content) 或焓 (enthapy), 是以热表示的总能量; T 是绝对温度; S 是熵 (entropy), 是一种处于混乱或无序状态中的能量, 是不能用来做有用功的能量。

根据热力学第二定律, 所有自然发生的过程, 总伴随有自由能的降低, 亦即在发生反应时必然要释放出自由能, 使反应趋向平衡。从理论上说, 所释放出的能量可以被利用, 并使之做功。化学反应中自由能的释放或利用体现了产物和反应物之间自由能含量的差别。所以化学反应中的自由能变化可表示如下:

$$\Delta G = G_{\text{产物}} - G_{\text{反应物}} \quad (2)$$

根据(1)式: $\Delta G = (H - TS)_{\text{产物}} - (H - TS)_{\text{反应物}}$

$$= (H_{\text{产物}} - H_{\text{反应物}}) - T(S_{\text{产物}} - S_{\text{反应物}})$$

亦即
$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (3)$$

在方程式(3)中, ΔG 是反应系统中自由能的变化; ΔH 是反应系统中热含量或焓的变化; ΔS 是反应前后熵的变化。当任何一个化学反应进行到它的平衡点时, 熵总是增加的。因而在自然界中, ΔS 总是一个正值。仅在理论上, 在一个理想系统中可以使某一反应进行而不伴随熵增。

在反应自发进行时, 反应系统的自由能必然降低。因此, 一个自发进行的反应系统的 ΔG 总是负的。当反应进行到平衡状态时, 没有自由能的变化, 即 ΔG 等于零。所以, 从处于平衡状态的反应中不可能得到能够做功的能量。在反应的平衡点上也没有熵的变化, 这时熵处于最大值。任何物理或化学的反应都有使其熵成为最大值的倾向。

当反应产物的自由能大于反应物的自由能时, 即当 ΔG 为正值时 ($\Delta G > 0$), 反应不能自发进行, 需要额外供给能量才能进行反应。这种反应称为吸能反应。

二、化学反应中自由能的变化

在常温常压下，对于一般涉及反应物 A 和 B 以及产物 C 和 D 的化学反应，即



其自由能变化具有下面的关系：

$$\begin{aligned}\Delta G &= RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]} - RT \ln K_{\text{平}} \\ &= 2.303RT \log \frac{[C][D]}{[A][B]} - 2.303RT \log K_{\text{平}}\end{aligned}\quad (4)$$

(反应开始时， 产物和反应物的 实际浓度比)	(处于平衡时 产物和反应物 的浓度比)
------------------------------	---------------------------

若反应是在标准条件下进行，即在温度（通常）为25℃、一个大气压、所有反应物和产物的初始浓度都为单位活度（ $a = 1.0$ ）或单位浓度（1.0mol/L）下的反应，那么(4)式可变为：

$$\begin{aligned}\Delta G &= 2.303RT \log 1 - 2.303RT \log K_{\text{平}} \\ &= 0 - 2.303RT \log K_{\text{平}} \\ &= -2.303RT \log K_{\text{平}}\end{aligned}\quad (5)$$

在标准条件下，自由能的变化称为标准自由能的变化，用 ΔG° 表示。所以(5)式应改写为：

$$\Delta G^\circ = -2.303RT \log K_{\text{平}}\quad (6)$$

这里 R 为气体常数（1.987cal·mol⁻¹·K⁻¹），T 为绝对温度（单位为 K）， $K_{\text{平}}$ 是平衡常数，系指在反应达到平衡时产物（C 和 D）和反应物（A 和 B）的浓度比，所以平衡常数 $K_{\text{平}}$ 为：

$$K_{\text{平}} = \frac{[C][D]}{[A][B]}\quad (7)$$

一旦我们测定了某个化学反应的平衡常数，就可以用每克分子反应物多少卡（cal.）来计算标准自由能的变化。卡是生物学中使用最广泛的一种能量单位，其定义是：以热的形式把温度为15℃的1克水升高1℃的能量。

对于任何一个给定的化学反应，标准自由能变化（ ΔG° ）都是一个常数，而化学反应的自由能变化（ ΔG ）则随所有参加物存在的浓度的变化而变化（见后述）。

若某一给定化学反应的平衡常数大于1.0，那么该反应标准自由能变化是负值（即 ΔG° ）

*ln 为自然对数，可换算为常用对数，即 $\ln x = 2.303 \log_{10} x$ ，简为 $2.303 \log x$ 。

<0)。如果某一给定的化学反应的平衡常数小于1.0,则 ΔG° 为正值(即 $\Delta G^\circ > 0$)。

由于化学反应标准自由能的变化规定了反应物和产物开始反应时的浓度为1.0mol/L(或两者的比值为1),那么标准自由能变化亦可看成是,在标准条件下,产物所固有的自由能与反应物所固有的自由能之差。这种固有的自由能在此条件下即为标准自由能。所以标准自由能变化又可以用下式表示:

$$\Delta G^\circ = G^\circ_{\text{产物}} - G^\circ_{\text{反应物}} \quad (8)$$

当 ΔG° 为负值时,意味着产物含有比反应物低的自由能,因而在标准条件下反应向形成产物的方向进行。当 ΔG° 是正值时,表示反应产物含有比反应物更高的自由能,因而在标准条件下,该反应趋向逆反应方向进行。当 $\Delta G = 0$ 时,反应处在平衡状态。化学反应的标准自由能的变化仅仅是表达它的平衡常数的一种不同的热力学方式。

表8-1 在标准条件下, K_π 、 ΔG° 和
化学反应之间的关系

当 K_π 是	ΔG° 是	化学反应的方向
>1.0	负值	正向进行
=1.0	零	在平衡状态
<1.0	正值	逆向进行

表8-2 化学反应平衡常数和标准自由能变化的数量关系

当 K_π 是	ΔG° (Cal·mol ⁻¹) 是
0.001	+ 4089
0.01	+ 2726
0.1	+ 1363
1.0	0
10.0	- 1363
100.0	- 2726
1000.0	- 4089

标准条件是人们规定的。但是,在生物体内的化学反应中,反应物和产物的浓度并不是在标准条件下,活细胞内的反应物和产物的浓度只是维持在一个窄小范围内的稳态水平,绝大多数反应从来未达到平衡。因此,在非标准条件下,自由能的变化可用下式计算(当然必须知道反应开始时所有化合物的浓度):

$$\begin{aligned} \Delta G &= 2.303RT \log \frac{[C][D]}{[A][B]} - 2.303RT \log K_\pi \\ &= \Delta G^\circ + 2.303RT \log \frac{[C][D]}{[A][B]} \end{aligned} \quad (9)$$

当 H^+ 作为反应物或产物出现时,其标准状态的浓度仍然规定为1.0mol/L(即 pH = 0)。但是,几乎所有的酶在 pH = 0时都已变性,因此就没有反应可供研究了。为此,生物化学家又规定了一种修正的标准条件,除 H^+ 之外,其他反应物和产物的浓度仍规定为1.0mol/L, $[H^+]$ 取生理上的数值,即 pH7被规定为生化能量学的标准 pH。生化系统标准自由能变化用 $\Delta G^{\circ'}$ 表示:

$$\Delta G^{\circ'} = -2.303RT \log K'_\pi$$

$$= -1363 \log K'_{\text{平}} \quad (\text{在 } 25^{\circ}\text{C}) \quad (10)$$

这里 $K'_{\text{平}}$ 是反应 pH7 时的平衡常数。

例如，在 pH7 和 25°C 的条件下，葡萄糖-6-磷酸酶催化 $\text{Glc-6-P} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Glc} + \text{Pi}$ 反应。若反应开始时 $[\text{Glc-6-P}]$ 为 0.1 mol/L (H_2O 的活度规定为 1.0)，平衡时只有 0.05% 的原始 Glc-6-P 存在，求该反应的 $K'_{\text{平}}$ 和 $\Delta G^{\circ'}$ 。

解：根据 (7) 式：

$$K'_{\text{平}} = \frac{[\text{Glc}][\text{Pi}]}{[\text{Glc-6-P}]} = \frac{(99.95\% \times 0.1)(99.95\% \times 0.1)}{0.05\% \times 0.1} = 1.998$$

根据 (10) 式：

$$\Delta G^{\circ'} = -2.303RT \log K'_{\text{平}}$$

$$= -1363 \log 199.8 = -3138 \text{ (Cal} \cdot \text{mol}^{-1})$$

这就是说，在标准条件下，葡萄糖-6-磷酸、葡萄糖和 Pi 都保持为单位活度时，每 1 mol/L 葡萄糖-6-磷酸转变为 1 mol/L 葡萄糖和 1 mol/L Pi ，释放出 3138 卡的能量。

但是，当反应物和产物的浓度不是 1 mol/L （即在非标准浓度）、但 $\text{pH} = 7$ 时（生物体内的化学反应往往如此）， ΔG 应按下式计算：

$$\begin{aligned} \Delta G &= \Delta G^{\circ'} + 2.303RT \log \frac{[\text{C}][\text{D}]}{[\text{A}][\text{B}]} \\ &= \Delta G^{\circ'} + 1363 \log \frac{[\text{C}][\text{D}]}{[\text{A}][\text{B}]} \end{aligned} \quad (11)$$

例如：人红细胞中，ATP、ADP 和 Pi 的浓度分别为 2.25 、 0.25 、 1.65 mol/L 。在 pH7、 25°C 下计算 ATP 水解反应的 ΔG （注： $\Delta G^{\circ'} = -7300 \text{ Cal} \cdot \text{mol}^{-1}$ ）。

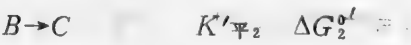
解：根据 (11) 式

$$\begin{aligned} \Delta G &= \Delta G^{\circ'} + 2.303RT \log \frac{[\text{ADP}][\text{Pi}]}{[\text{ATP}]} \\ &= -7,300 + 1363 \log \frac{[0.25 \times 10^{-4}][1.65 \times 10^{-3}]}{[2.25 \times 10^{-3}]} \\ &= -7,300 + 1363(-3.74) = -12400 \text{ (cal} \cdot \text{mol}^{-1}) \end{aligned}$$

从此例我们可以看出，在非标准条件下，化学反应所释放自由能的多少取决于反应物和产物各自的起始浓度。

关于能量的单位，按照国际规定，能量的基本 SI (Système International) 单位是焦耳 (Joule，简为 J)，在生物学和医学中，热和能的计量通常以卡 (Calorie，简为 Cal.) 来表示。卡和焦耳很容易换算： $1.000 \text{ Cal} = 4.184 \text{ J}$ 。

我们还必须注意这样一个热力学事实，即一个连续反应的总的自由能变化等于各分步反应的自由能变化之和。在两个连续的化学反应的情况下，



每一个反应都有它自己的平衡常数和它特有的标准自由能变化 ($K'_{\text{平}1}$ 和 $\Delta G_1^{0'}$ 以及 $K'_{\text{平}2}$ 和 $\Delta G_2^{0'}$)。由于两个反应是连续的，故 B 可以省去，总反应是：

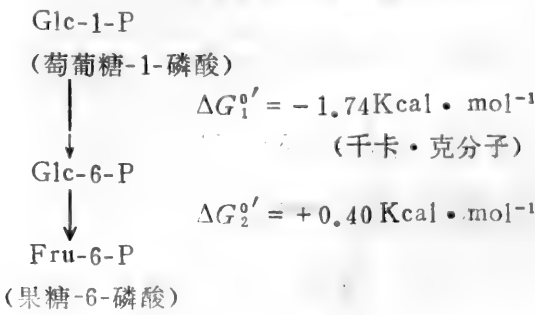


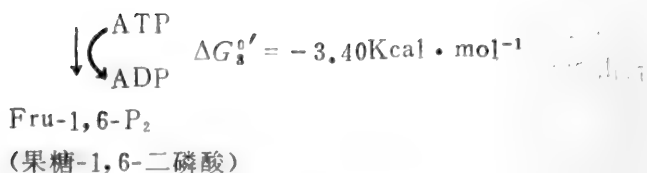
反应 $A \rightarrow C$ 也应有它自身的平衡常数和标准自由能的变化 ($K'_{\text{平总}}$ 和 $\Delta G_{\text{总}}^{0'}$)。前面我们提到 $\Delta G^0 = G^0_{\text{产物}} - G^0_{\text{反应物}}$ ，不管由反应物到产物要经过多少步，该差值总是同一数值。那么，我们就可以得到标准自由能变化的两个重要的性质：

①分步进行的反应1、2、3、…，其总平衡常数 $K'_{\text{平总}}$ 等于各分步反应平衡常数的乘积，即 $K'_{\text{平总}} = K'_{\text{平}1} \times K'_{\text{平}2} \times K'_{\text{平}3} \times \dots$ ；其总的标准自由能变化 $\Delta G_{\text{总}}^{0'}$ 等于各分步反应标准自由能变化之和，即 $\Delta G_{\text{总}}^{0'} = \Delta G_1^{0'} + \Delta G_2^{0'} + \Delta G_3^{0'} + \dots$ ，并且具有 $\Delta G_{\text{总}}^{0'} = -2.303 RT \log K'_{\text{平总}}$ 的关系。

②可表示成两个或多个连续反应之和的某单一反应，其平衡常数 $K'_{\text{平总}}$ 等于各个反应平衡常数之积，即 $K'_{\text{平总}} = K'_{\text{平}1} \times K'_{\text{平}2} \times K'_{\text{平}3} \times \dots$ ；其标准自由能变化 $\Delta G_{\text{总}}^{0'}$ 等于各个反应标准自由能变化之和，即 $\Delta G_{\text{总}}^{0'} = \Delta G_1^{0'} + \Delta G_2^{0'} + \Delta G_3^{0'} + \dots$ ；并且也具有 $\Delta G_{\text{总}}^{0'} = -2.303 RT \log K'_{\text{平总}}$ 的关系。

例如：当肌糖元降解时，发生下列反应：





求总反应: $\text{Glc-1-P} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{Fru-1,6-P}_2 + \text{ADP}$ 的 $\Delta G_{\text{总}}^{\circ'}$ 和 $K'_{\text{平总}}$ 。

解:
$$\Delta G_{\text{总}}^{\circ'} = \Delta G_1^{\circ'} + \Delta G_2^{\circ'} + \Delta G_3^{\circ'}$$

$$= -1.74 + (+0.40) + (-3.40) = -4.74 (\text{Kcal} \cdot \text{mol}^{-1})$$

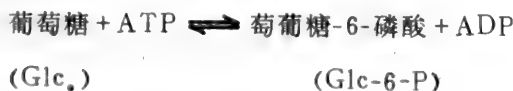
根据 $\Delta G_{\text{总}}^{\circ'} = -2.303 RT \log K'_{\text{平总}}$,

所以
$$\log K'_{\text{平总}} = \frac{\Delta G_{\text{总}}^{\circ'}}{-2.303 RT} = \frac{-4740}{-1363} = 3.47$$

即 $K'_{\text{平总}} = 2591$

又例如: 已知在 pH7 和 25℃ 的条件下, ATP 水解的 $\Delta G^{\circ'} = -7300 \text{ cal} \cdot \text{mol}^{-1}$, Glc-6-P 水解的 $\Delta G^{\circ'} = -3138 \text{ cal} \cdot \text{mol}^{-1}$, $K'_{\text{平}} = 199.8$ 。求己糖激酶催化葡萄糖和 ATP 反应的 $\Delta G^{\circ'}$ 和 $K'_{\text{平}}$ 。

解: 己糖激酶催化的反应是:

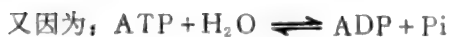


$$\Delta G_1^{\circ'} = -3138 \text{ cal} \cdot \text{mol}^{-1}, K'_{\text{平}_1} = 199.8.$$



$$\Delta G_2^{\circ'} = +3138 \text{ cal} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$K'_{\text{平}_2} = \frac{1}{199.8} = 5 \times 10^{-3}$$



$$\Delta G^{\circ'} = -7,300 \text{ cal} \cdot \text{mol}^{-1}$$

根据公式 $\Delta G^{\circ'} = -2.303RT \log K'_{\text{平}}$

所以 $K'_{\text{平}_3} = 4.42 \times 10^5$

而 $\text{Glc} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{Glc-6-P} + \text{ADP}$ 可看成

是②和③两步反应之和:



所以: $\Delta G_4^{\circ'} = \Delta G_2^{\circ'} + \Delta G_3^{\circ'} = +3138 + (-7300)$

$= -4162 (\text{cal} \cdot \text{mol}^{-1})$.

$$K'_{\text{平}_4} = K'_{\text{平}_2} \times K'_{\text{平}_3} = 5 \times 10^{-3} \times 4.42 \times 10^5 = 2.21 \times 10^3$$

从上面的例子中, 我们可以看出, 吸能反应同高度放能反应相偶联就能进行到底 (如己糖激酶催化的反应)。在顺序反应中, 前面的吸能反应只要一形成产物, 就会立即被后面的放能反应消耗掉, 从而推动总的反应顺序向右进行 (例如酵解途径中的反应)。

三、氧化还原电势与自由能变化的关系

1. 氧化还原反应与氧化还原电势

在生物氧化中包括许多氧化还原反应。所谓氧化还原反应 (Oxido-reduction) 是指电子从一种物质转移到另一种物质上的化学反应。在这样的反应中, 供出电子的物质叫做还原剂 (Reducing agent, or reductant), 供出电子后本身则被氧化; 接受电子的物质叫做氧化剂 (Oxidizing agent, or Oxidant), 接受电子后本身则被还原。

氧化还原反应往往是可以逆的。还原剂供出电子后变成氧化型, 氧化型再接受电子后又变成还原型。例如:



电子供体 电子受体



电子供体 电子受体

在上面的反应中, H_2 是电子供体, 而 H^+ 是电子受体; Fe^{2+} (亚铁离子) 是电子供体, Fe^{3+} (正铁离子) 是电子受体。 $\frac{1}{2}\text{H}_2$ 和 H^+ 、 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 分别构成了氧化还原(电)对 (redox pair), $\text{H}^+/\frac{1}{2}\text{H}_2$ 和 $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ 。

一个氧化还原对失去电子或得到电子的倾向，例如 Fe^{2+} 失去电子或 Fe^{3+} 得到电子的倾向，就叫做氧化还原电势或称氧化还原电位 (Oxidation-reduction potential)。氧化还原电势是可以定量的。在标准条件下，每一个氧化还原对都有一个标准的氧化还原电势 (用 E_0 表示)。对一个给定氧化还原对来说，它是一个常量。标准氧化还原电势是样品 (被检氧化还原对) 半电池 (half cell) 在标准条件下相对于标准参考半电池所具有的电动势 (Electromotive force, 简称为 EMF)，以伏特 (V) 表示。标准条件是指氧化型和还原型的浓度都是 1mol/L 、温度为 25°C 的条件。若有气体参加，则还需在一个大气压。标准参考半电池是标准氢半电池，在 25°C 、 $[\text{H}^+]$ 为 1.0mol/L ($\text{pH}=0$)、一个大气压的氢

气压力等条件下，硬性规定它的氧化还原电势为零，即 $E_0=0.0$ 。

在测定样品半电池的标准氧化还原电势时，将两个铂电极分别插入样品半电池和参考半电池中，组成样品电极和氢电极。用外接线路把两个电极连接起来，电路中间安上一个检流计。两个半电池用含有饱和 KCl 溶液的琼脂盐桥连接起来。电子将从样品电极流向氢电极，或从氢电极流向样品电极。电子流动的方向取决于两个半电池各自所具有的电子压或失去电子的倾向。

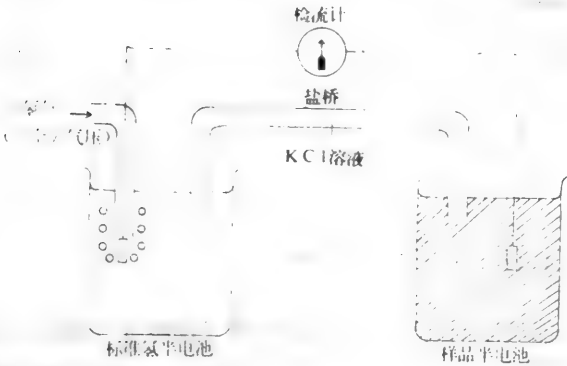
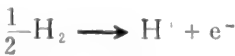


图 8—2 标准氧化还原电势的测定

但是，电子的流动方向总是自发地从电子压高或失去电子倾向大的电极 (这一极称为负极) 流向电子压低的或失去电子倾向小的另一电极 (这一极称为正极)。由于规定了标准氢电极的氧化还原电势为零，所以检流计所指示的电动势就是被检样品的标准氧化还原电势 (E_0)。若被检氧化还原对的 E_0 为正值，例如 $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ 的 $E_0=+0.77$ ，则表示氧化型 Fe^{3+} 得到电子的倾向比 H^+ 大，或者说，还原型 Fe^{2+} 失去电子的倾向比 H_2 小。这也就是说，电对 $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ 中 Fe^{3+} 得电子倾向比 Fe^{2+} 失电子倾向大， H_2 失电子的倾向比 H^+ 得电子的倾向大；在 $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ 电对与 $\text{H}^+/\frac{1}{2}\text{H}_2$ 电对组成的原电池中， $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ 电对就从 $\text{H}^+/\frac{1}{2}\text{H}_2$ 电对获得电子，从而使 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} ：



发生在两个半电池中的反应为：

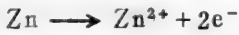


反之亦然，例如电对 Zn^{2+}/Zn 的 $E_0=-0.763$ ，表示 Zn^{2+} 得电子的倾向比 Zn 失电子的倾向小， H^+ 得电子的倾向比 Zn 失电子的倾向大。这就是说，电对 $2\text{H}^+/\text{H}_2$ 从电对 Zn^{2+}/Zn

/Zn.得到电子, 2H^+ 还原为 H_2 。



发生在两个半电池中的反应:



将任何一个氧化还原对所组成的半电池与标准氢半池相偶联构成原电池, 都可以测定其标准氧化还原电势。

但是, 发生在生物体内的氧化还原反应是在生理 pH 下进行的。为此, 将生物体内的氧化还原对的标准电势另作了规定, 即除了规定氧化型和还原型的浓度为 1mol/L (或单位活度)、温度为 25°C 外, 还规定 pH 值取生理上的 pH7。在这样的标准条件下与上述标准氢电极 (pH 仍为零) 偶联, 测定的标准氧化还原电势用 E'_0 表示。表 8—3 是生物体内的一些重要的氧化还原对的标准氧化还原电势 (E'_0)。请注意, 在 pH7 时, 即 $\text{pH} \neq 0$ 时标准氢电极的氧化还原电势不是零, 而是 -0.413 伏。

表 8—3 是按照氧化还原对的标准氧化还原电势增高, 即失去电子的倾向降低的顺序列

表8—3 参与生物体内氧化性代谢的一些电对的 E'_0

氧化还原(电)对	E'_0 (伏)(pH7)
乙酰 CoA + CO_2 + 2H^+ + $2\text{e}^- \rightarrow$ 丙酮酸 + CoA	- 0.48
$2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$	- 0.42
α -酮戊二酸 + CO_2 + 2H^+ + $2\text{e}^- \rightarrow$ 异柠檬酸	- 0.38
$\text{NAD}^+ + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NADH} + \text{H}^+$	- 0.32
$\text{NADH脱氢酶(FMN)} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NADH脱氢酶(FMNH}_2\text{)}$	- 0.30
1,3-二磷酸甘油酸 + $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow$ 3-磷酸甘油醛 + Pi	- 0.29
乙醛 + $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow$ 乙醇	- 0.197
丙酮酸 + $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow$ 乳酸	- 0.185
草酰乙酸 + $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow$ 苹果酸	- 0.166
$\text{FAD} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{FADH}_2$	- 0.12*
延胡索酸 + $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow$ 琥珀酸	- 0.03
$\text{CoQ} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{CoQH}_2$	+ 0.10(?)
细胞色素 b(Fe^{3+}) + $\text{e}^- \rightarrow$ 细胞色素 b(Fe^{2+})	+ 0.06
细胞色素 c_1 (Fe^{3+}) + $\text{e}^- \rightarrow$ 细胞色素 c_1 (Fe^{2+})	+ 0.23
细胞色素 c(Fe^{3+}) + $\text{e}^- \rightarrow$ 细胞色素 c(Fe^{2+})	+ 0.25
胞色素 a(Fe^{3+}) + $\text{e}^- \rightarrow$ 细胞色素 a(Fe^{2+})	+ 0.29
细胞色素 a_3 (Fe^{3+}) + $\text{e}^- \rightarrow$ 细胞色素 a_3 (Fe^{2+})	+ 0.55
$\frac{1}{2} \text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}$	+ 0.82

* FAD FADH_2 可值代表处在游离状态的标准氧化还原电势。当它与黄素蛋白结合在一起时, 因同不同的酶结合, 它的标准氧化还原电势在 $0.00 - +0.03$ 伏之间变化。

出来的。氧化还原电势相对比较负的电对与相对比较正的电对具有较大的还原力。相反，后者则比前者有较大的氧化能力。如果电对 NAD^+/NADH ($E'_0 = -0.32$ 伏) 与电对丙酮酸/乳酸 ($E'_0 = -0.19$ 伏) 组成原电池，那么，在标准条件下电对丙酮酸/乳酸则从电对 NAD^+/NADH 获得电子，使丙酮酸还原为乳酸，而 NADH 本身被氧化成 NAD^+ 。所以，表 8—3 从上到下，氧化还原对的还原能力逐渐降低，而氧化能力逐渐增加；从下到上，电对的氧化能力逐渐降低，而还原能力逐渐增强。表 8—3 中最上面的电对可使其下的每一个电对还原；最下面的电对可使其上的每一个电对氧化。

若半电池中的氧化型和还原型处在非标准条件下，但在 pH7 (生物体内的氧化还原反应通常如此)，则氧化还原对的氧化还原电势可由下面的 Nernst 方程计算。

$$E = E'_0 + \frac{RT}{n\mathcal{F}} \ln \frac{[\text{氧化型}]}{[\text{还原型}]}$$

$$= E'_0 + \frac{2.303RT}{n\mathcal{F}} \log \frac{[\text{氧化型}]}{[\text{还原型}]} \quad (12)$$

式中： E 代表某电对在非标准条件（但在 pH7）下的氧化还原电势；

E'_0 代表该电对的标准氧化还原电势；

n 为传递的电子数；

\mathcal{F} 是法拉第常数，其值是 $23062 \text{ Cal} \cdot \text{V}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ，或 $96485 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$ (库仑·克分子⁻¹)；

R 是气体常数，其值为 $1.987 \text{ Cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ，或 $8.314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ；

T 为绝对温度，用 K 表示 ($K = 273 + ^\circ\text{C}$)；

$[\]$ 表示摩尔浓度。

2. 氧化还原电势与自由能变化的关系

在标准条件下，电子从氧化还原电势低的电对（负极）流向氧化还原电势较高的电对（正极）的倾向是自由能降低的结果。因为电子总是趋于向反应系统的自由能降低的方向流动。当电子从氧化还原电势低的电对转移到氧化还原电势较高的电对时，两个氧化还原对之间的标准氧化还原电势的差越大，自由能就降得越大。只要我们把两个电对的关系没搞错，那么两电对之间的标准氧化还原电势之差 ($\Delta E'_0$) 就很容易计算：

$$\Delta E'_0 = E'_{0\text{正极}} - E'_{0\text{负极}} \quad (13)$$

这里 E'_0 正极代表发生还原反应的一极的标准氧化还原电势（对于自发进行的反应来说，正极的氧化还原电势较高）； $E'_{0\text{负极}}$ 代表发生氧化反应的一极的标准氧化还原电势（对于自发进行的反应来说，负极的氧化还原电势较低）。

氧化还原反应的标准自由能变化 ($\Delta G^{0'}$) 与 $\Delta E^{0'}$ 之间有如下的关系：

$$\Delta G^{0'} = -n\mathcal{F}\Delta E'_0 \quad (14)$$

式中 n 为转移电子的数目， \mathcal{F} 为法拉第常数。如果我们已知发生氧化还原反应的两个电对的标准电势，我们就能利用 (14) 式计算氧化还原反应的标准自由能的变化。例如，当一对电子从 NAD^+/NADH 电对 ($E'_0 = -0.32$ 伏) 传递到 $\frac{1}{2}\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ 电对 ($E'_0 = +0.82$ 伏)

时，其反应的标准自由能变化是：

$$\begin{aligned}\Delta G^{\circ'} &= -n\mathcal{F}\Delta E^{\circ}_0 = -2 \times 23062 \times [0.82 - (-0.32)] \\ &= -52.6(\text{Kcal})\end{aligned}$$

氧化还原反应的 $K'_{\text{平}}$ 和 $\Delta G^{\circ'}$ 与 ΔE°_0 有如下的关系：

$$\Delta G^{\circ'} = -2.303 RT \log K'_{\text{平}}$$

而

$$\Delta G^{\circ'} = -n\mathcal{F}\Delta E^{\circ}_0$$

所以，

$$-2.303RT \log K'_{\text{平}} = -n\mathcal{F}\Delta E^{\circ}_0$$

即：

$$\begin{aligned}\Delta E^{\circ}_0 &= \frac{2.303RT}{n\mathcal{F}} \log K'_{\text{平}} \quad (15) \\ &= \frac{0.059}{n} \log K'_{\text{平}} \quad (\text{在 } 25^{\circ}\text{C}).\end{aligned}$$

当氧化还原反应的 ΔE°_0 已知时，就可以求反应的 $\Delta G^{\circ'}$ ，进而可求出 $K'_{\text{平}}$ 。如果我们求出了氧化还原反应的 $K'_{\text{平}}$ ，亦可计算氧化还原反应标准自由能的变化和标准氧化还原电势的变化在非标准条件下，自由能的变化 (ΔG) 可用下式求得：

$$\begin{aligned}\Delta G &= -n\mathcal{F}\Delta E \\ &= -n\mathcal{F}(E_{\text{正极}} - E_{\text{负极}}) \quad (16)\end{aligned}$$

第三节 ATP 在能量转移中的作用

一、生物体内的高能磷酸化合物

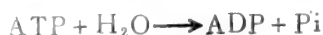
生物体内的磷酸化合物很多，并不是所有的磷酸化合物都是高能的。例如，我们在后面将要遇到的葡萄糖-6-磷酸、果糖-6-磷酸、 α -磷酸甘油等等。这些化合物较稳定，水解后只能释放出1,000—3,000卡的能量，这类化合物称为低能化合物。在生物体内还有一类为数不多的磷酸化合物，此类化合物不稳定，水解时能释放出5,000—14,000卡的能量，这类化合物则称为高能化合物。

生物体内的高能磷酸化合物有腺嘌呤核苷三磷酸（即 ATP）、1,3-二磷酸甘油酸、磷酸烯醇式丙酮酸、乙酰磷酸、磷酸肌酸、……。其中 ATP 是最主要的高能磷酸化合物，而其他的高能化合物只能作为高能磷酸基（ $\sim P$ ）的供体，将高能磷酸基转移至 ADP（腺嘌呤核苷二磷酸）上生成 ATP，本身很少直接参与其他吸能反应。除了高能磷酸化合物外，生物体内还含有其他高能化合物，如乙酰 CoA 等。

二、ATP 的特殊作用

1. ATP 水解时标准自由能变化

当 ATP 的末梢磷酸基 (γ -位上) 被水解时, 其标准自由能变化是 $-7.3\text{Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。



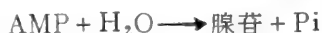
$$\Delta G^{\circ'} = -7.3\text{Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$$

产物 ADP 还含有一个高能磷酸基 (β -位上), 它被水解时标准自由能变化也是 $-7.3\text{Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。



$$\Delta G^{\circ'} = -7.3\text{Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$$

但是, AMP 进一步被水解时, 标准自由能变化只有 $-3.4\text{Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。



$$\Delta G^{\circ'} = -3.4\text{Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$$

所以, AMP 不是高能化合物, 而是低能化合物。

为什么 ATP 在水解时能释放出较高的自由能呢? 这主要是由 ATP 的特殊分子结构决定的。在 ATP 的分子结构中存在着两种不稳定因素, 即静电斥力和相反共振现象 (opposing resonance) 或竞争共振现象 (competing resonance)。这两种不稳定因素使得 ATP 分子的结构不稳定。结构愈不稳定, 愈容易被水解, 水解时释放出的自由能也就愈多。

静电斥力比较容易理解的。因为在生理 pH 下, ATP 几乎完全解离为 ATP^{4-} 离子, 即带有四个负电荷。这些负电荷在空间上很接近, 因而产生了很强的斥力。负电荷间的相互排斥作用使得整个分子产生了结构张力 (structure strain), 其中 —P—O—P— 键受到的影响最大。

相反, 共振作用是由于在相邻的两个磷原子之间夹着一个氧原子。氧原子上存在有未共用电子, 而磷原子因 P=O 和 P—O^- 键的诱电子效应带有部分正电荷。于是, 在两个相邻的磷原子之间存在着竞争氧原子上的未共用电子的现象 (如图 8-3 所示)。这种作用的结果势必影响到 ATP 分子的结构稳定性。

由此, 我们可以看出, 一个化合物水解时所释放出的自由能的多少完全取决于反应的产物和反应物的化学结构, 换句话说, 就是取决于产物和反应物各自所固有的标准自由能。

由于高能磷酸化合物 (或其他高能化合物) 水解时释放出很高的自由能, 因此往往称这类化合物含有高能 (磷酸) 键。但是, 这必须与物理化学上的高能键区别开来。在物理化学上, 化学键的断裂需要输入能量, 输入的能量越多键就愈稳, 这种键就愈不容易断裂。而在生物化学上, 所指的高能键赋予了特定的含义, 即“高能键”系指水解反应或基团转移反应中可以释放出大量自由能。键的水解所放出的自由能愈多, 这个键就愈不稳定, 愈容易被水

解而断裂。

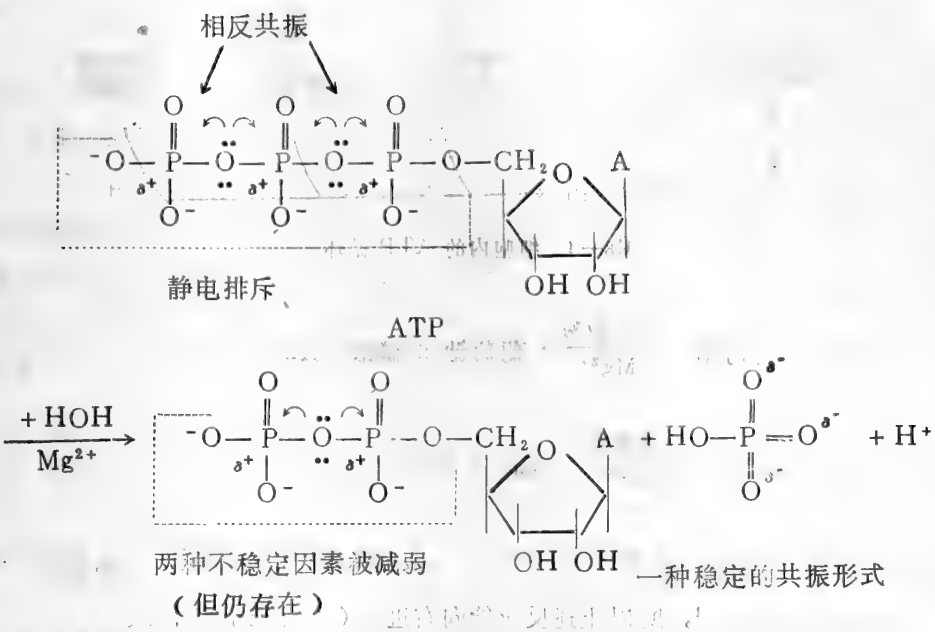


图8-3 ATP 结构中的静电排斥和相反共振

这里尚需说明的是，在完整细胞内，ATP、ADP 以及 Pi 的浓度并不是在标准条件下，它们的实际浓度比1mol/L 低得多。因此，在完整细胞内，ATP 水解所释放出来的自由能不是-7.3Kcal·mol⁻¹，实际上比标准自由能变化高得多，在大多数细胞中是在-12至-16 Kcal·mol⁻¹ 范围内。例如前面曾计算过红 细胞中的 ATP 水解，其自由能变化是-12.4Kcal·mol⁻¹。

2. ATP 是细胞产能反应和需能反应的主要化学联系物

化学反应可分为放能反应和吸能反应。放能反应是指那些产生能量的反应，这些反应进行时可以做功。吸能反应是指那些利用（需要）能量的反应，即必须对它做功才能进行的反应。在活细胞内，产生能量的反应与需能反应是偶联进行的。但是，这种偶联很少是两个反应的共同催化作用，即产生能量的反应不是与需要能量的反应直接结合起来，而是通过第三者在这两个反应中起中间桥梁作用。这第三者就是 ATP。

当细胞营养物进行分解代谢时，产生大量的能量，这些能量中的相当大的一部分推动着由 ADP 和 Pi 合成ATP，即释放出来的能量暂时输入到 ATP 分子中。然后 ATP 作为能量的供体参与许多需能反应，例如生物合成反应、生物分子或离子的主动运输(active transport)、肌肉收缩等（图8-4）。

3. ATP 具有较高的转移磷酸基的势能

ATP 能够把它的磷酸基转移到不同的受体分子，产生低能量 的磷酸化合物。这些反应都是通过激酶（Kinases）催化的。例如在 激酶的催化下，ATP 上的末端磷酸基可以转移到葡萄糖或甘油分子上，生成能量较低的磷酸化合物。

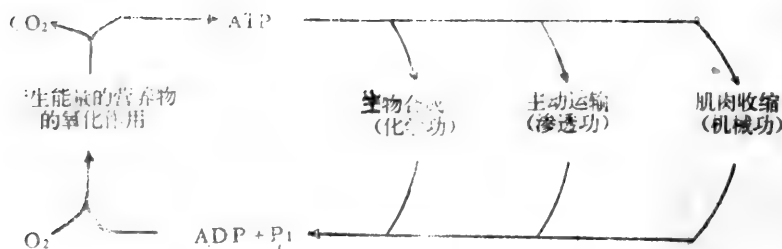
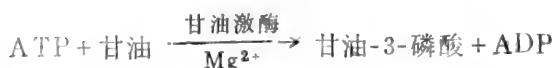
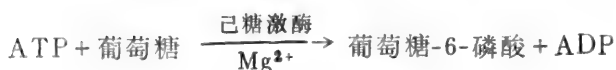


图8—4 细胞内的 ATP 循环



由于葡萄糖-6-磷酸和甘油-3-磷酸水解时释放出来的自由能分别是 $\Delta G^{\circ'} = -3.3 \text{Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 和 $\Delta G^{\circ'} = -2.2 \text{Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ ，所以上述反应能向右进行（在标准条件下）。

葡萄糖-6-磷酸和甘油-3-磷酸与它们未磷酸化的形式相比，具有较高的能量，可以把它们当成葡萄糖和甘油的激活形式，可以进一步经受酶促反应，用以合成分子量更大的分子（糖原和脂肪）。

在葡萄糖降解成乳酸的酵解途径中，产生两个重要的高能中间物，即1,3-二磷酸甘油酸和磷酸烯醇式丙酮酸，它们水解时可以分别产生 $\Delta G^{\circ'} = -11.8 \text{Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 和 $-14.8 \text{Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 的自由能。但是，在活细胞内，它们并不经受水解作用，而是将它们的高能磷酸基转移到ADP上，合成ATP。催化这两个反应的酶分别是磷酸甘油酸激酶和丙酮酸激酶。

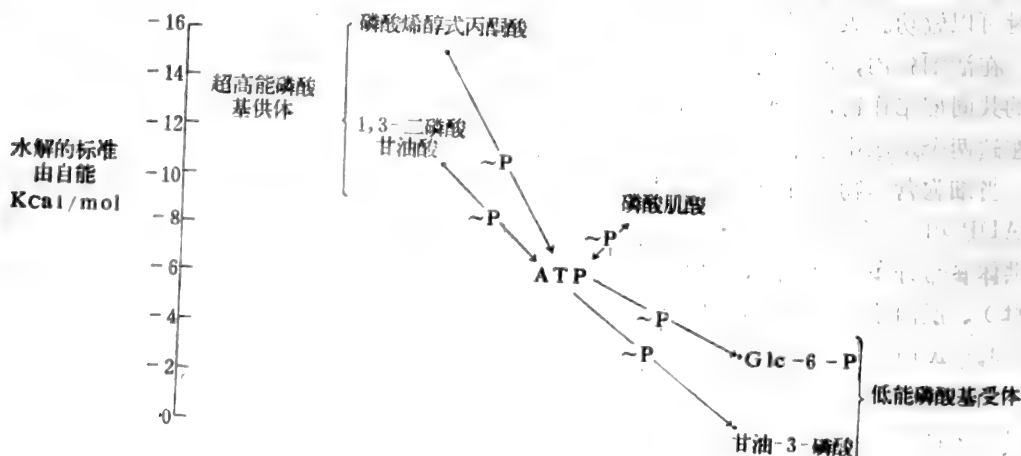
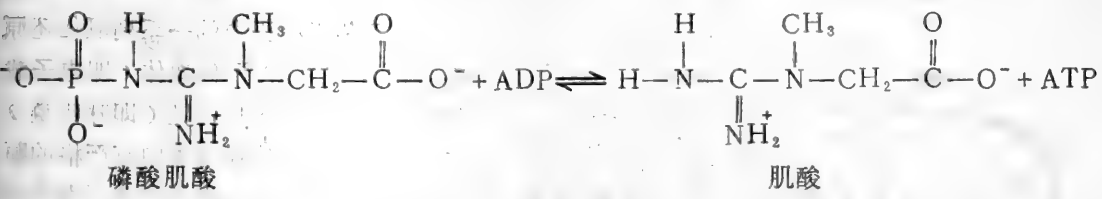


图8—5 磷酸基转移趋势

由此我们可以看出，在细胞内，超高能量的磷酸化合物必须经过ATP才能把它们的磷酸基转移给低能量的磷酸受体分子。ATP在细胞酶促磷酸基的转移中是一个“共同的中间体”。

在高等脊椎动物的肌肉及其易兴奋的组织（例如脑和神经）中，有一种高能化合物，它起一种特殊的作用，这个化合物叫做磷酸肌酸（Phosphocreatine），它被水解时， $\Delta G^{\circ} = -10.3 \text{Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ ，比ATP水解时产生更多的自由能。通过肌酸激酶的催化，可以把磷酸肌酸的磷酸基转移给ADP而生成ATP。磷酸肌酸的功能是，在肌肉细胞中维持ATP的高水平。由于磷酸肌酸的含量大约是ATP的3—4倍，所以当肌肉短期剧烈运动时，它可以维持ATP水平的恒定。当细胞内的ATP浓度很高时，ATP上的磷酸基通过肌酸激酶的催化，转移到肌酸上，以磷酸肌酸的形式贮存起来。



在许多无脊椎动物中，是磷酸精氨酸（Phosphoarginine）而不是磷酸肌酸作为高能磷酸基的贮存形式。这种起着贮存能量作用的物质叫做“磷酸原”（Phosphagens）。

第四节 电子传递与氧化磷酸化

在第一节，我们曾经提到，从被氧化的代谢物（底物）上脱下的电子经过一系列的氧化还原反应，最终使氧还原而激活，并与由脱氢酶催化所释放到介质中的H⁺结合生成水，在此过程中伴随着自由能的释放和ATP的生成。在生物化学上，把这种偶联发生的现象叫做氧化磷酸化（Oxidative phosphorylation）。所以，氧化磷酸化实际上包括两个不同的反应过程，即电子传递过程中的产能的氧化还原反应和吸能的产生ATP的磷酸化反应。

氧化磷酸化是异养生物获取能量的主要方式。在真核生物中，氧化磷酸化反应发生在线粒体内膜上；在原核生物中，没有线粒体结构，氧化磷酸化反应发生在细胞膜上。

一、线粒体内膜是发生氧化磷酸化的部位

线粒体是真核生物的重要细胞器之一。线粒体膜分为内外两层，每层都是由蛋白质和脂类所构成的双分子层。外膜平滑，稍有弹性。外膜对大多数小分子物质和离子是可渗透的。内膜向内折叠形成嵴（cristae），其作用是扩张内膜的表面，与电子传递有关的各组分以及ATP生成有关的酶和蛋白质就定位在内膜和嵴上。内膜与外膜相反，对几乎所有的离子和大多数无电荷的分子是不可渗透的。内膜内侧是液态基质（matrix）。基质含有物质氧化分解的许多酶以及其他酶类和蛋白质（表8—1）。线粒体的这种结构和组成特征是与它作为细胞“发电站”的功能密切相关的。当细胞处在不同呼吸状态时，线粒体的超微结构也

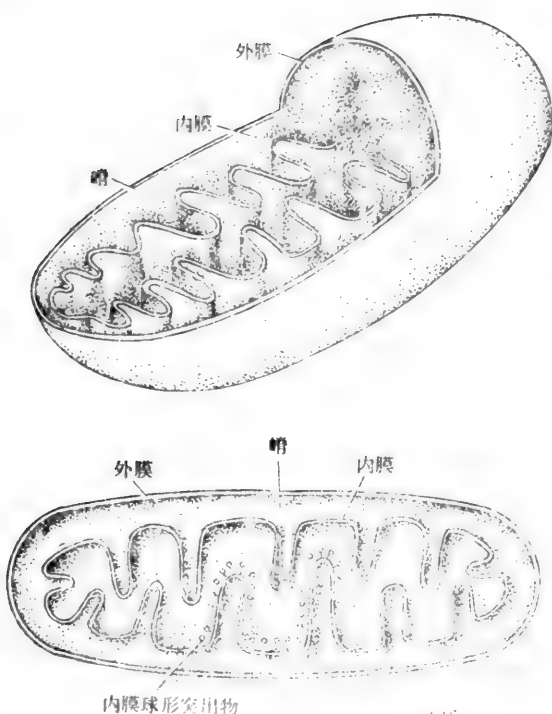


图8—6 线粒体结构示意图

相应发生明显的变化，这表现在基质的体积和内膜折叠状态的变化上。

线粒体是一种半自主组装细胞器，它本身含有共价闭合的环状 DNA，仅能部分控制合成本身所需要的结构和功能蛋白。线粒体所含有的几百种蛋白质，大多数都是由核基因编码的，在胞液中合成之后再转运到线粒体的特定部位上。

二、电子传递链的组成和顺序

电子传递过程中的一系列氧化还原反应是由许多电子传递体（即电子载体）所组成的电子传递链（即呼吸链）完成的。电子在传递过程中有严格的顺序。这种传递顺序是由每个电子载体的氧化型和还原型所构成的电对的氧化还原电势所决定的。电子从氧化还原电势较低的载体上传递到氧化还原电势较高的载体上（图8—7）。因此，电子传递链（electron-transport chain）或呼

表8—4 线粒体各部位上分布的主要酶类和蛋白质

部位	酶或蛋白质	部位	酶或蛋白质
外膜：氨基 CoA 合成酶 单胺氧化酶核苷二磷酸激酶		膜间空间：腺苷酸激酶	
内膜：电子传递链各组分 琥珀酸脱氢酶 ATP 合成酶系统 肉毒碱-酰基转移酶 ATP 转移系统以及其他转移系统		基质：丙酮酸脱氢酶复合物 除琥珀酸脱氢酶外的 TCA 循环的各种酶 β-氧化的各种酶 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶	

吸链（respiratory chain）是指具有严格排列顺序的电子载体所构成的体系（图8—8）。

电子传递链的主要组分包括烟酰胺腺嘌呤核苷酸、黄素蛋白、铁-硫蛋白、辅酶 Q，以及细胞色素类，它们在细胞线粒体内膜上的定位关系与它们在电子传递链中的严格顺序是一致的（见图8—11）。

1. 烟酰胺腺嘌呤核苷酸（NAD 和 NADP⁺）

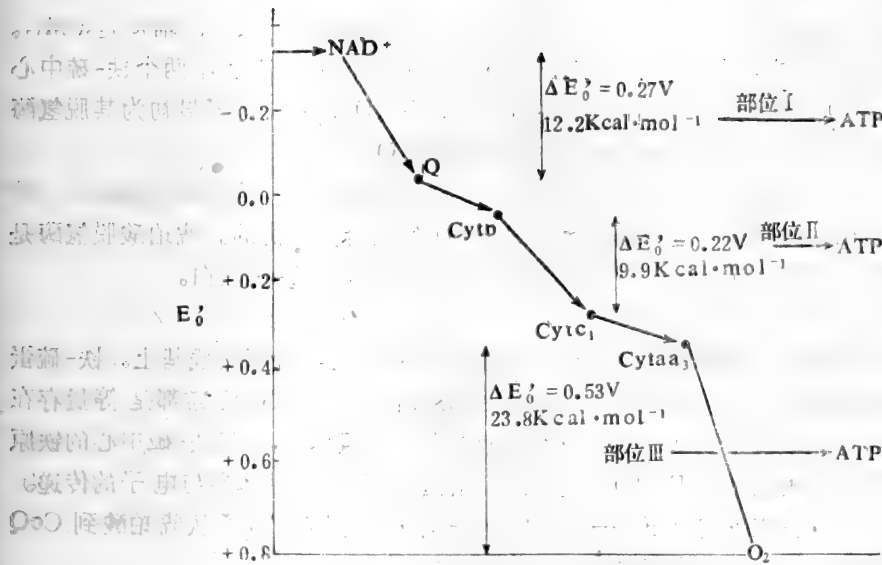


图8—7 线粒体电子传递链的电子流动方向和 ATP 生成的关系

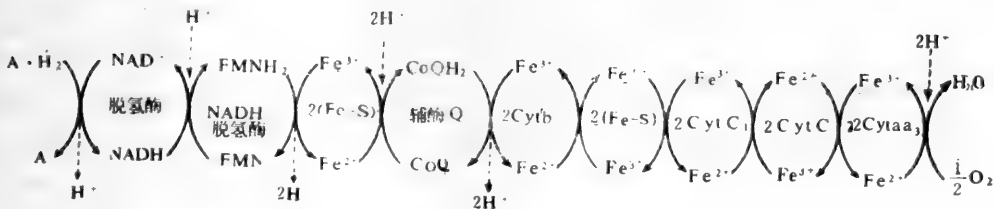


图8—8 哺乳动物线粒体电子传递链

烟酰胺腺嘌呤核苷酸是许多脱氢酶的辅酶。NAD⁺和 NADP⁺ 的烟酰胺部分是接受电子的部位。这部分内容已在“维生素”中作了介绍。

大多数脱氢酶对 NAD⁺是专一的，只有少数的脱氢酶（例如葡萄糖-6-磷酸脱氢酶）以 NADP⁺ 作为辅酶。当然也有的脱氢酶（例如谷氨酸脱氢酶）两者都可以作为辅酶。以 NAD⁺ 或 NADP⁺ 作为辅酶的脱氢酶，有的位于胞液中，有的位于线粒体中，有的在两部分都存在。胞液中的脱氢酶只与胞液中的 NAD⁺ 或 NADP⁺ 结合。同样，线粒体内的脱氢酶只能与线粒体中的 NAD⁺ 或 NADP⁺ 结合。胞液中的和线粒体中的 NAD⁺ 和 NADP⁺ 被线粒体内膜隔开，彼此不能自由通过。

由于大多数脱氢酶是以 NAD⁺ 作为辅酶，所以从不同的底物上脱下的电子都可以集中到同一分子 NAD⁺ 上，然后以还原型（NADH）的形式进入到呼吸链。

2. 黄素蛋白

有几种需要黄素核苷酸（FMN 和 FAD）作为辅基的酶参与了电子传递。这类酶叫做黄素蛋白（flavoproteins 简为 fp）或黄酶（flavoenzymes）。黄素蛋白的辅基或是 FMN，或是 FAD。接受电子的部位是在异咯嗪环上。在多数情况下，黄素核苷酸同酶蛋白的结合

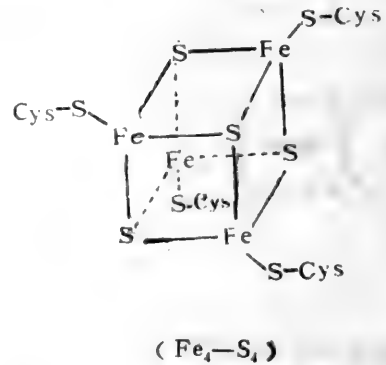
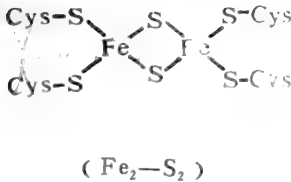
虽不是共价的，但结合得很紧密，故有辅基之称。

NADH 脱氢酶（也叫做 NADH-CoQ 还原酶）是一种黄素蛋白，该酶的辅基是 FMN。NADH 脱氢酶是一种多体酶，含有16个亚基。该酶除含 FMN 外，还含有两个铁-硫中心（iron-sulfur center），因而这个酶又称为铁-硫蛋白。NADH 上的电子最初为其脱氢酶的辅基 FMN 所接受，然后通过几个铁-硫中心转移到辅酶 Q 上。

此外，琥珀酸脱氢酶、脂酰 CoA 脱氢酶等是以 FAD 为辅基的。琥珀酸脱氢酶是一种膜结合蛋白，位于线粒体内膜上。琥珀酸脱氢酶同 FAD 的结合是共价的。琥珀酸脱氢酶是琥珀酸-CoQ 还原酶复合物的组分之一，该复合物的另一个组分是铁-硫蛋白。

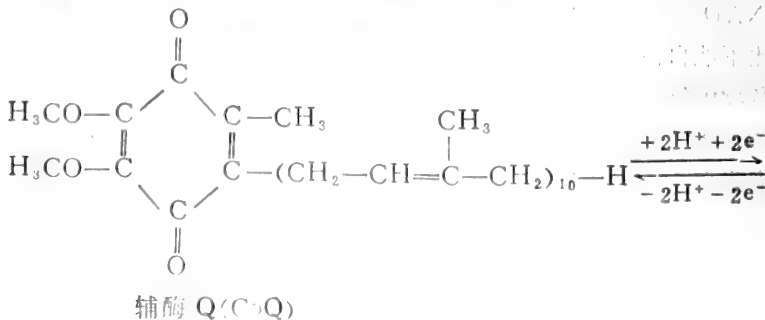
3. 铁-硫蛋白 (Iron-sulfur proteins)

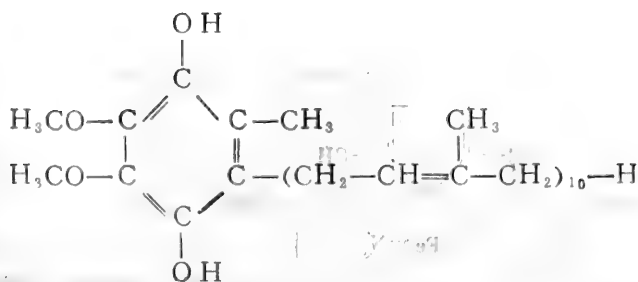
铁-硫蛋白是一类复杂的蛋白质，铁和硫结合到这类蛋白质的半胱氨酸残基上。铁-硫蛋白是一类非血红素铁蛋白（不含血红素）。在铁-硫蛋白中，铁和硫通常都是等量存在（ Fe_2-S_2 和 Fe_4-S_4 是最普遍的）。当铁-硫蛋白作为电子载体时，其铁-硫中心的铁原子能以氧化型（ Fe^{3+} ）和还原型（ Fe^{2+} ）的形式作为电子的受体和供体参与电子的传递。NADH 脱氢酶含有两个铁-硫中心（ Fe_2-S_2 和 Fe_4-S_4 ）。另外，电子从琥珀酸到 CoQ 以及从 CoQ 到细胞色素 C 的传递中都涉及到铁-硫蛋白。



4. 辅酶 Q

辅酶 Q (CoQ) 也叫做泛醌 (Ubiquinone)，是电子传递链中的唯一的一种非蛋白组分。不同来源的 CoQ 的基本结构相同，只是在侧链上的异戊二烯单位的数目存在差别。动物线粒体的 CoQ 侧链含有10个异戊二烯单位，用 CoQ_{10} 表示。其他种类的生物中含有6—8个异戊二烯单位。细菌 CoQ 的侧链含有6个异戊二烯单位。





还原型的辅酶 Q (CoQH₂)

CoQ 可被还原为氢醌 (Hydroquinone)，这一反应是可逆的，是 CoQ 作为电子载体的基础 (如上式所示)。从图8—7和图8—11中我们可以看出,它占据着电子传递链的中心。它是电子传递过程中的电子集中点。来自 NADH 和 FADH₂ 上的电子都必须经过该点最终传递到氧分子上。由于 CoQ 是电子传递链中唯一不与其他蛋白质紧密结合的电子载体，异戊二烯基尾链是非极性的，它能促进 CoQ 在线粒体内膜的碳氢相中迅速扩散，这就允许它作为一种流动着的电子载体在黄素蛋白和细胞色素之间起作用。

5. 细胞色素 (Cytochromes)

细胞色素是一类含铁的蛋白质。但是，与上面所介绍的铁-硫蛋白不一样，细胞色素中的铁是作为卟啉的一部分。含铁的原卟啉称为血红素 (heme)。所以细胞色素是一类含铁卟啉辅基 (即血红素) 的蛋白质。这类蛋白质只存在于需氧细胞中，在把电子从 CoQ 传递到氧分子的过程中起着重要作用。某些细胞色素也存在于内质网上，在各种羟化反应中起作用。

表8—5 细胞色素的分子量和光吸收特性

细胞色素	分子量	吸收带		
		α	β	γ
b	25,000	563	532	429
c	12,500	550	521	415
c ₁	37,000	554	524	418
a	≈600,000	600	缺乏	439
a ₃		604	缺乏	443

细胞色素的吸收光谱位于可见光范围内。当它们处于还原状态时，都有三条吸收谱带，称为 α 、 β 、 γ 带，也叫索里特氏带 (Soret bands) (图8—9)。根据在 α -吸收带的实际波长可分为 a、b、c 三类细胞色素 (表8—5)。在哺乳动物线粒体电子传递链中，至少存在 b、

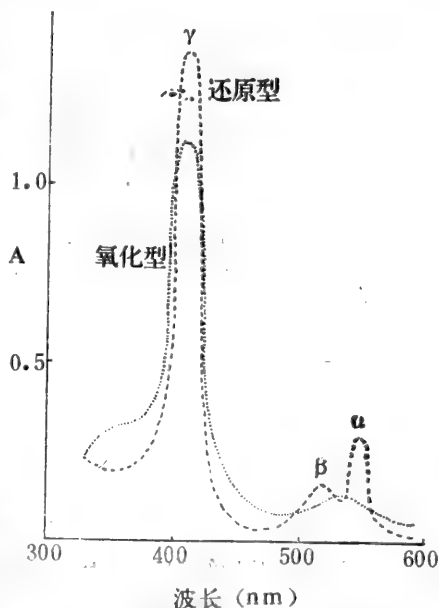


图8—9 细胞色素c 的氧化型和还原型在pH7.0时的吸收光谱，处在还原型时， α 、 β 、 γ 带清晰可见。

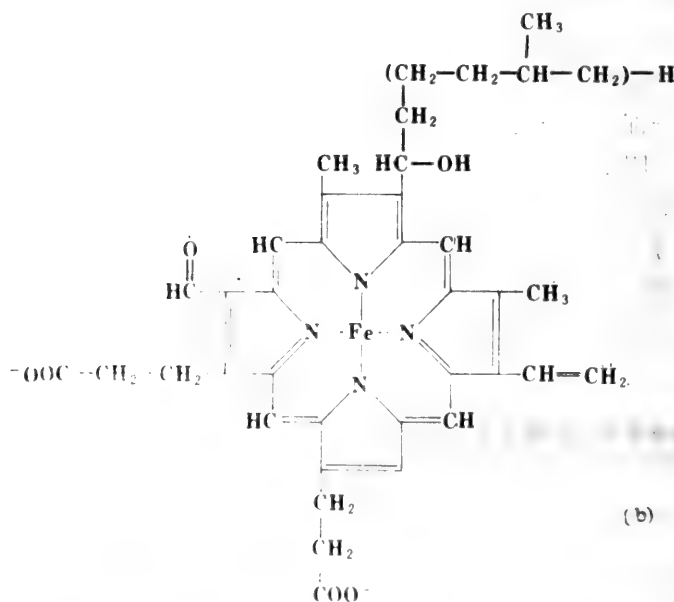
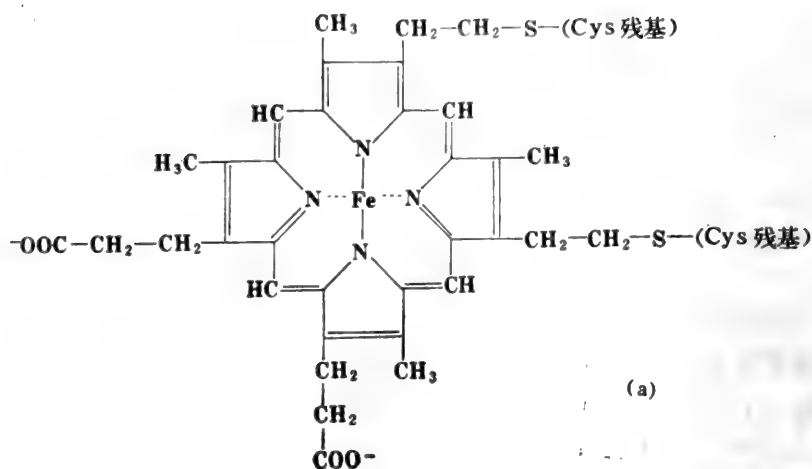


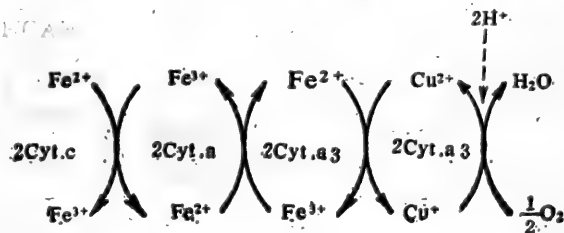
图8—10 血红素(a)和血红素 A(b)的结构

c、c₁、a 和 a₃等五种细胞色素蛋白。细胞色素 b、c 和 c₁ 都含有血红素（含铁的原卟啉），这一点与血红蛋白和肌红蛋白相同。在细胞色素 b 中，血红素是以非共价的方式与蛋白质多肽链相连，而细胞色素 c 和 c₁ 的血红素是以共价键的方式同蛋白质部分相连（见第三章第三节）。但是，细胞色素 a 和 a₃ 含有一个修饰的叫做血红素 A (heme A) 的辅基。血红素 A 和血红素的主要区别是前者的卟啉环第 8 位取代基是甲酰基而不是甲基，在第 2 位上是长碳链疏水基取代了乙烯基（图8—10）。

细胞色素 b、c₁、a 和 a₃ 都是完全的膜结合蛋白。近来的证据揭示，细胞色素 b 有两组分。即 b_L 和 b_H。b_L 是氧化还原的载体（即电子载体）；b_H 与电子传递和氧化磷酸化偶联有关。

细胞色素 a 和 a_3 作为一个复合物出现在电子传递链的末端，与电子从细胞色素 c 传递到氧分子直接相关，所以细胞色素 aa_3 又叫做细胞色素 c 氧化酶或细胞色素氧化酶。由于细胞色素 b、 c_1 和 aa_3 的疏水性质以及它们同线粒体内膜结合在一起，使得它们成为一类难以溶解和难以研究的蛋白质。但是，细胞色素 c 在水中是可溶的，它是一种膜外周蛋白 (peripheral membrane protein)。细胞色素 c 的这种特性允许它在电子传递链的两个片段（即复合物）之间起传递电子的联系作用（见后）。在电子传递链中，所有这些细胞色素都是通过它们的铁原子的价态变化 ($Fe^{3+} + e^- \rightleftharpoons Fe^{2+}$) 来接受和供出电子的。

这里尚需指出的是，细胞色素 a_3 还含一个铜原子，铜原子也可通过它的价态变化 ($Cu^{2+} + e^- \rightleftharpoons Cu^+$) 传递电子。所以在电子传递链末端的电子传递过程可能是如右图所示。



三、电子传递链的组织结构

在电子传递链中，电子的流动方向总是从标准氧化还原电势较低的载体流向标准氧化还原电势较高的载体上，而且这种流向有着严格的顺序，不能超越其间的第二载体而流向第三个载体上。例如，NADH 只能把它上面的两电子传递到 NADH 脱氢酶上，而不能直接传递到细胞色素 b 或 c 上。这表明电子传递链中的电子载体在膜结构上有着严格的组织顺序和定位关系。后来，从线粒体内膜上分离出了功能上相当的电子载体的结构复合物。这些结构复合物是：

复合物 I (NADH 脱氢酶复合物)：由 NADH 脱氢酶和它的铁-硫中心构成。

复合物 II (琥珀酸—CoQ 还原酶复合物)：由琥珀酸脱氢酶和铁-硫蛋白构成。

复合物 III (CoQ—细胞色素 c 还原酶复合物)：由细胞色素 b 和 c_1 以及一个特殊的铁-硫蛋白构成。

复合物 IV (细胞色素 c 氧化酶复合物)：由细胞色素 a 和 a_3 组成。

NADH、CoQ 和细胞色素 c 在这几个复合物之间起着桥梁作用 (图8—11)。

一些特殊电子传递链抑制剂的使用对电子传递链的组织结构的研究有着特殊的意义。鱼藤酮 (Rotenone) 和安密妥 (Amytal) 能阻止电子从 NADH 传递到 CoQ (部位①)；抗霉素 A (Antimycin A) 能阻止电子从 CoQ 到细胞色素 c 的传递 (部位2)；氰化物和一氧化碳能阻止电子从细胞色素 aa_3 到氧的传递。这些抑制作用可以通过电子载体的吸收光谱的改变而证实。因为电子载体处于还原状态与处于氧化状态的吸收光谱是不相同的。在抑制点前的电子载体处于还原状态，抑制点后电子载体则处于氧化状态。图8—9是细胞色素 c 的还原态与氧化态的吸收光谱比较。

通过以上的事实可以证明，电子是以从 NADH 到 CoQ (或者从琥珀酸到 CoQ)、从 CoQ 到细胞色素 c、从细胞色素 c 到分子氧的顺序传递的。这一传递顺序分别是由 NADH 脱氢酶 (或者琥珀酸—CoQ 还原酶)、CoQ-细胞色素 c 还原酶和细胞色素 c 氧化酶催化

完成的。在每种情况下，电子的转移都伴随着质子的吸收和释放，因此电子通过复合物的迁移必定与质子跨膜泵送相偶联。由于放能的电子转移与质子的泵送偶联，因而也与电化学能（即电化学梯度）偶联，这种电化学能作为质子推动力贮存在膜表面（见后述）。所以每个复合物代表了一种沿电子传递链的能量转换部位。

其他以 FAD 作为辅基的脱氢酶，例如脂酰 CoA 脱氢酶和磷酸甘油脱氢酶也是膜结合蛋白，它们以与琥珀酸脱氢酶相似的作用方式把电子传递到 CoQ 上。

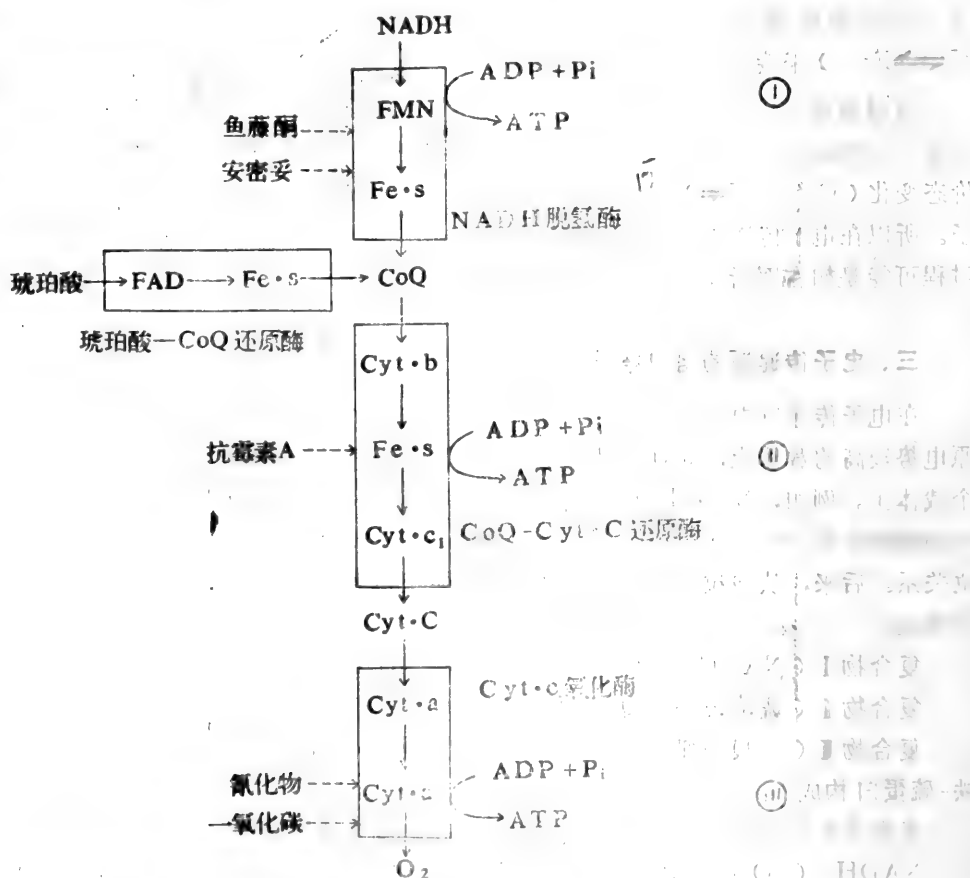


图8—11 电子传递链各复合物的组织顺序、ATP的生成部位、以及电子传递链抑制剂的作用部位

四、氧化磷酸化

在本节的开头已指出，氧化磷酸化是指电子从被氧化的底物上传递到氧的过程中所释放出的自由能推动 ADP 酶促磷酸化生成 ATP 的过程。因此氧化磷酸化又叫做电子传递磷酸化。电子沿呼吸链（电子传递链）传递所释放出的自由能可推动多少个分子的 ATP 的合成以及在什么部位上合成是这里所要说明的问题。

1. 磷-氧比 (P/O) 和 ATP 的合成部位

现已证明，相同数量的电子，通过不同的呼吸链产生的 ATP 的数量是不相同的，即不同的呼吸链有着不同的磷酸化效率 (efficiency of phosphorylation)。所以，在细胞呼

吸中，为了定量地表示每个被利用的氧原子所产生的 ATP 摩尔数，就采用了 P/O（或 P/2e⁻）比。所谓 P/O 比，是指当一对电子通过呼吸链传递到氧时所产生的 ATP 的分子数。当一对电子从 NADH 传递到氧时产生了三分子的 ATP，所以 P/O 比是 3。于是就提出了这样一个概念，即在电子由 NADH 传递到氧的途径中有三个不连续的 ATP 生成部位。通过各种不同的实验，这三个产生 ATP 的部位在呼吸链中已被确定（图8—11）。

第一个部位是 NADH 到 CoQ。在抗霉素 A（它能阻止电子从 CoQ 传递到细胞色素 c）的存在下，以铁氰化物（含 Fe³⁺）作为人工电子受体，并测定 P/O 比，得到 P/O 为 1 的结果，从而证实了电子传递链的这一部分（NADH—CoQ）是 ATP 生成的部位 1。用类似的方法证明部位 2 是 CoQ—细胞色素 c，部位 3 是细胞色素 c—O₂。这三个部位的电子传递反应分别是由 NADH 脱氢酶（部位 1）、CoQ—细胞色素 c 还原酶（部位 2）和细胞色素 c 氧化酶（部位 3）催化的。这三个部位的氧化还原反应所产生的自由能足以推动由 ADP 生成 ATP（图8—7）。

但是，延胡索酸/琥珀酸电对的 E_{0'} 是 -0.031 伏，因此琥珀酸氧化脱下的电子不能使 NAD⁺ 还原（因为 NAD⁺/NADH 的 E_{0'} = -0.32 伏），但却可以使琥珀酸脱氢酶的辅基 FAD 还原（因为处在与不同酶蛋白结合状态的 FAD/FADH₂ 的 E_{0'} 为 0.0—+0.3 伏）。同时也不可能在琥珀酸还原 CoQ 的过程中有 ATP 生成。因为 ATP 的合成需要大约 0.20 伏的 ΔE_{0'} 值（实际计算的 ΔE_{0'} = 0.158 伏）。由于琥珀酸氧化提供的一对电子在 CoQ 的水平上进入到呼吸链，它的 ΔE_{0'} 只有 0.131 伏，所以只能在部位 2（复合物 III）和部位 3（复合物 IV）分别形成 1 分子的 ATP，其 P/O 比是 2 而不是 3。复合物 I 的复杂结构在于保证 CoQ 的还原。

2. ATP 的合成与电子传递偶联

在正常的生理条件下，电子传递与磷酸化紧密地偶联。不仅 ATP 的形成关键性地取决于电子的流动，而且紧密的偶联意味着电子的流动仅当 ATP 能被合成时才发生。这是一种重要的调节机制，因为它意味着细胞中的 [ATP]/[ADP] 的比例在呼吸链的活性调节中起重要的作用。氧化磷酸化的必要条件是：NADH（或其他电子源）、O₂、ADP 和 Pi。当然，调节氧化磷酸化速度的重要的因素是 ADP，因为其他三种因素很少以限速浓度（Rate-limiting concentration）存在。氧化磷酸化速度受 ADP 调节的这种方式叫做呼吸控制（Respiratory control）或受体控制（Acceptor control）。呼吸控制的意义是很清楚的。当 ATP 因做细胞功而很快消耗时，ATP 的水平降低，ADP 的水平升高，而且 ADP 的可用性意味着在热力学上和动力学上都有利于磷酸化。在这种情况下，ATP 的合成因而受到刺激，电子被传递，辅酶（电子载体）重新循环，底物被氧化，氧被消耗，此时细胞处于活跃呼吸状态（第三呼吸状态）（图8—12）。但是，当 ATP 在细胞中积累时，ADP 的浓度就相反地降低，电子传递减慢或停止，电子载体以还原的形式存在，氧化型的载体不再用作电子的受体，整个呼吸代谢过程被有效地抑制（图8—12）。此时细胞处在休眠状态（第四呼吸状态）。所以，氧化磷酸化与细胞对 ATP 的需要是精心偶联的，以便使电子从有机燃料分子流向氧与细胞对能量的需要一致。

3. 氧化磷酸化的解偶联剂和抑制剂

某些特殊的抑制剂在研究氧化磷酸化发生的过程中起很重要的作用。前面已经谈到电子

传递抑制剂在呼吸链组织结构的研究和 ATP 生成部位的研究中所起的作用。这里将简单介绍氧化磷酸化的解偶联剂和抑制剂。

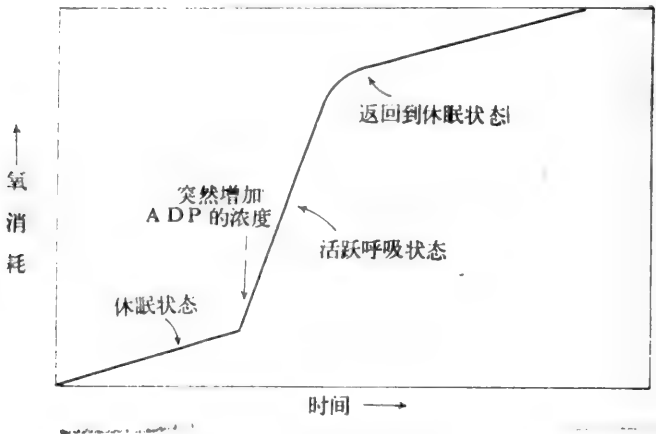
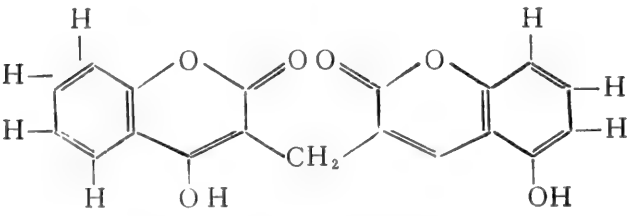


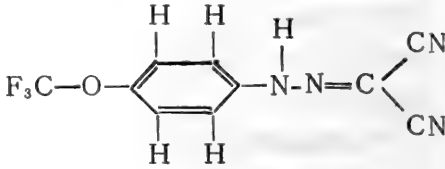
图8-12 呼吸的受体控制

(1)解偶联剂 (Uncouplers)

所谓解偶联，顾名思义，就是使电子传递过程与 ATP 的生成相分离。解偶联剂对电子传递没有抑制作用，但能抑制由 ADP 生成 ATP 的磷酸化作用。结果是，氧过度消耗，底物利用没有障碍，能量以热的形式消散。了解得最为清楚的解偶联剂是 2,4-二硝基苯酚 (DNP)，其他解偶联剂大多也是酸性的芳香族化合物，例如双羟香豆素和对-三氟甲氧羰酰苯胺。



双羟香豆素



对-三氟甲氧羰酰苯胺

解偶联剂的解偶联作用只是对电子传递链的磷酸化作用是专一的，对在底物水平上发生的磷酸化作用没有影响，这就使得这些解偶联剂对于氧化磷酸化的研究成为很有用的试剂(见后述)。

(2)抑制剂 (inhibitors)

氧化磷酸化抑制剂对氧的消耗和 ATP 的形成都有抑制作用。但是，与电子传递抑制剂不同，它们对呼吸链的电子传递没有任何直接的抑制作用，但却能直接抑制 ATP 的合成。

由于这类抑制剂抑制了由电子传递而产生的高能状态去合成 ATP 的过程，结果也使电子传递不能继续。寡霉素属于这类抑制剂。

氧化磷酸化抑制剂和电子传递抑制剂是可以区别的。如果抑制作用因加入解偶联剂例如 DNP 而被解除者则是前者（只是解耦对电子传递的抑制），若不能解除者是后者（见图 8—13）。

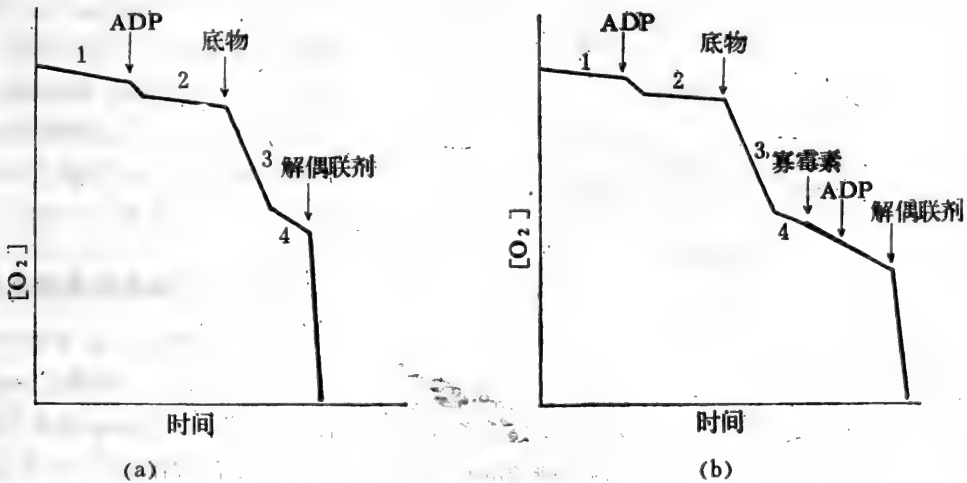


图 8—13 线粒体呼吸的不同状态（用 1、2、3、4 表示）

状态 1 是在可利用的底物和 ADP 都缺乏的情况下发生的；

状态 2 是在加入了 ADP，但底物仍缺乏的情况下发生的；

状态 3 是在 ADP 和底物都已加入的情况下发生的；

状态 4 是在有底物存在，但 ADP 已被消耗尽的情况下发生的；

图 a 表示当加入解偶联剂后，刺激氧的消耗；

图 b 表示加入抑制剂后，氧的消耗被抑制，但加入解偶联剂后，解除了对氧消耗的抑制。

4. ATP 合成酶

合成 ATP 的酶系统位于线粒体内膜上。这个酶系统或酶复合物叫做 ATP 合成酶或 F_0F_1 -ATPase。ATP 合成酶含有两个主要的成分， F_1 和 F_0 （F 是偶联因素 factor）。 F_1 从线粒体内膜伸入到基质中，形状与门上的球形握手相似。 F_1 是由 Racker 及其同事首先从线粒体抽提和纯化的，并确定它是一个很大的寡聚体，分子量约为 380,000，由五种不同的亚基构成， F_1 不能单独以它的分离形式催化 ADP 和 P_i 合成 ATP，但它却可以使 ATP 水解成 ADP 和 P_i ，因而 F_1 也叫做 F_1 -ATP 酶（ F_1 ATPase）。当把 F_1 小心地从亚线粒体颗粒分离出来时，这种颗粒只能催化电子传递，却不能合成 ATP。这是因为缺乏 F_1 的亚线粒体颗粒仍然含有完整的电子传递链，而不含 F_1 的缘故。当把可溶性的 F_1 在适当条件下加回到缺乏 F_1 的亚线粒体颗粒中去时，一种正常的膜结构又重新形成（图 8—14），亚线粒体颗粒的电子传递和合成 ATP 的这种偶联能力得以恢复。这表明线粒体内膜上的酶有催化电子传递的作用，而可溶性的 F_1 则是合成 ATP 不可缺少的因素。

F_0 被埋置在线粒体内膜中并穿透内膜。当跨膜的质子推动力（Proton motive force, 简称 pmf）可被用来推动 F_1 催化 ATP 合成时， F_0 是作为质子流动的通道。 F_0 也含有几

种疏水的亚基。

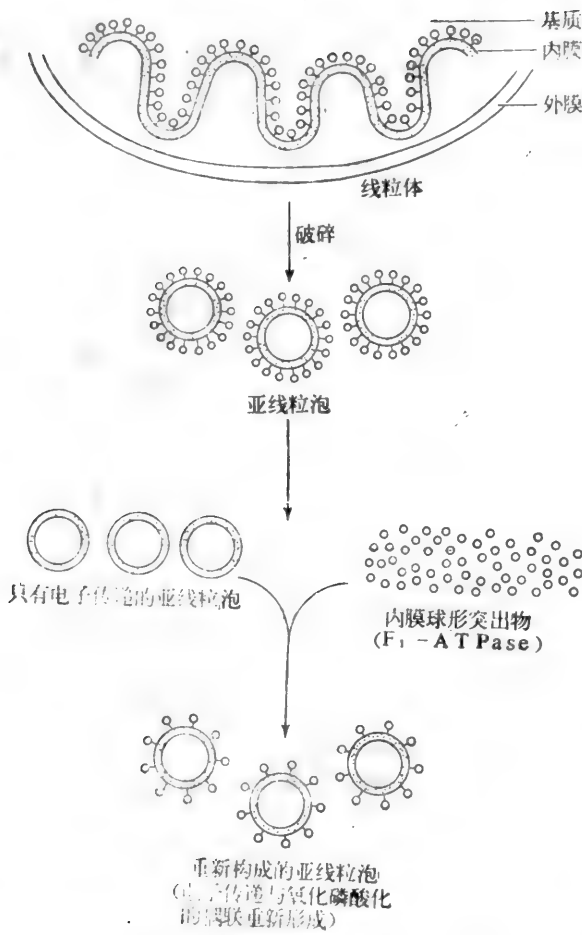


图8—14亚线粒体颗粒的解离和重新形成，并伴随 ATP 合成酶活性失去的与恢复

量是怎样传递给反应 $\text{ADP} + \text{Pi} \longrightarrow \text{ATP}$ 的。

1. 化学偶联假说

化学偶联假说 (Chemical coupling hypothesis) 是 E. C. Slater 于 1953 年提出来的，是用来解释氧化磷酸化偶联机制的最早的一个假说。这个假说认为氧化磷酸化是一种与酵解过程中的磷酸化反应相当的过程进行的。这种磷酸化反应涉及高能磷酸中间物的形成，然后高能的中间物把活化的磷酸基转移到 ADP 上形成 ATP。所以这个假说的主要内容可用图 8—16 来说明。图中的 C—1 和 C—2 代表与磷酸化部位有关的电子载体，I 代表一未知的偶联中间物。在电子传递过程中，中间物 I 与其中的一个载体（这里是 C—2）形成一个高能复合物 C—2 red- I，这个复合物的形成是电子传递释放的自由能推动的。第二步这个复合物经受一种与 Pi 的交换反应，产生 I-P 并与载体分离。I-P 是偶联中间物的高能磷酸化的形式。最后将 I-P 上活化的 Pi 基在 ATP 合成酶的催化下转移给 ADP 而合成

从外形上看，ATP 合成酶的 F_1 和 F_0 之间有一个柄 (stalk)。这个柄起着支撑 F_1 的作用，并使 F_1 和 F_0 相连 (图 8—15)。这个柄也含有几种多肽链，其中有一种叫做寡霉素敏感性授与多肽。寡霉素是 ATP 合成酶的抑制剂，因而也是氧化磷酸化的有效抑制剂。这个柄可能有调节质子流动，从而抑制 ATP 合成速度的能力。

五、氧化磷酸的偶联机制

虽然磷酸化生成 ATP 与电子传递相偶联的这一性质已经确定，但是关于电子传递链与 ATP 合成酶究竟怎样合作完成 ATP 生成则仍然是有争议的、未完全解决的问题。已经提出了三种假说来解释磷酸化与电子传递的偶联。一种是化学偶联假说，第二是构象偶联假说，第三种是化学渗透假说。其中，化学渗透假说是最受欢迎的。但是，实际的偶联机制可能涉及所有三种假说。不管什么样的解释，都必须回答这样问题：①电子传递是怎样把能量授与线粒体内膜的；②能

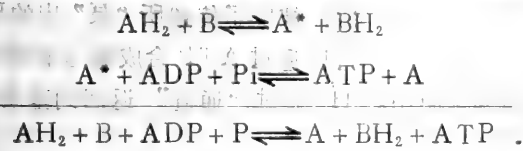
ATP, I 又重新释放出来。

这一学说的提出,曾对氧化磷酸化机制的研究起过积极的作用。但该学说的致命弱点是未找到 I-P 这个高能磷酸中间物。另外,该假说也不能解释为什么线粒体内膜的完整性对氧化磷酸化是必要的。

2. 构象偶联假说

构象偶联假说 (Conformational coupling hypothesis) 是由 P. Boyer 提出来的。这一假说指出,电子沿呼吸链传递过程中,引起线粒体内膜中的蛋白质

组分的构象发生变化,转变成高能状态。那么构象的变化所产生的能量使 ATP 合成酶激活,也转变成高能状态。处在高能状态的 ATP 合成酶重新恢复到原来的正常构象时,所释放出的能量推动 ATP 的合成。



这里: A* 代表电子(氢)载体 A 的高能构象状态。这一假说实质上与化学偶联假说相似,只不过这一假说认为电子传递所释放的自由能不是贮存在某种高能磷酸中间物上而是贮存在蛋白质的立体构象中。

3. 化学渗透假说

化学渗透假说 (Chemiosmotic hypothesis) 是英国生物化学家 P. Mitchell 于 1961 年提出来的。这一假说认为电子在传递过程中伴随着 H⁺ 从线粒体内膜内侧的基质向内膜外侧的介质转移。其结果是,内侧基质的 pH 增高,而外侧介质的 pH 降低。内膜相当于一个质子(H⁺)“泵”。这种质子“泵”利用电子传递过程中产生的能量作为把 H⁺ 逆质子梯度转移到外侧去的推动力。与 H⁺ 的排出相伴随的是跨膜的电位的形成,因为 H⁺ 从基质转移到外侧使得内膜外侧变得电正些,而内侧变得电负些。这样,电子传递产生了一种电化学梯度。这种电化学梯度(Δμ_H[~])包含两个因素,即跨膜的电位(Δψ)和膜内外的 pH 差(ΔpH)。

$$\Delta\mu_{H^+}^{\sim} = \Delta\psi - 2.303RT\Delta\text{pH}/\mathcal{F}$$

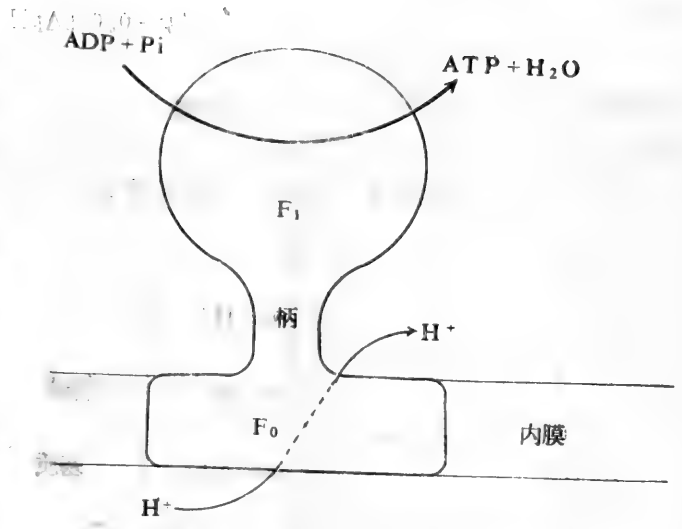


图 8-15 ATP合成酶的结构模式

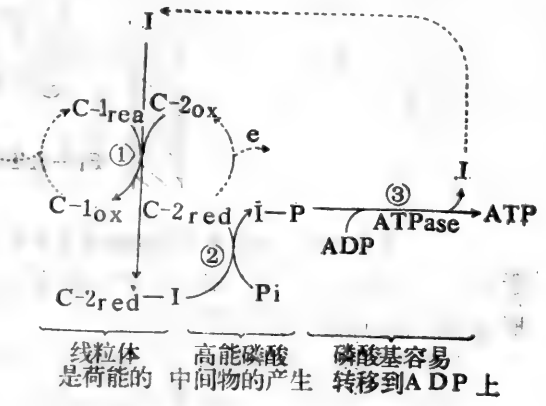


图 8-16 化学偶联机制

$$= \Delta\psi - 0.059\Delta\text{pH}$$

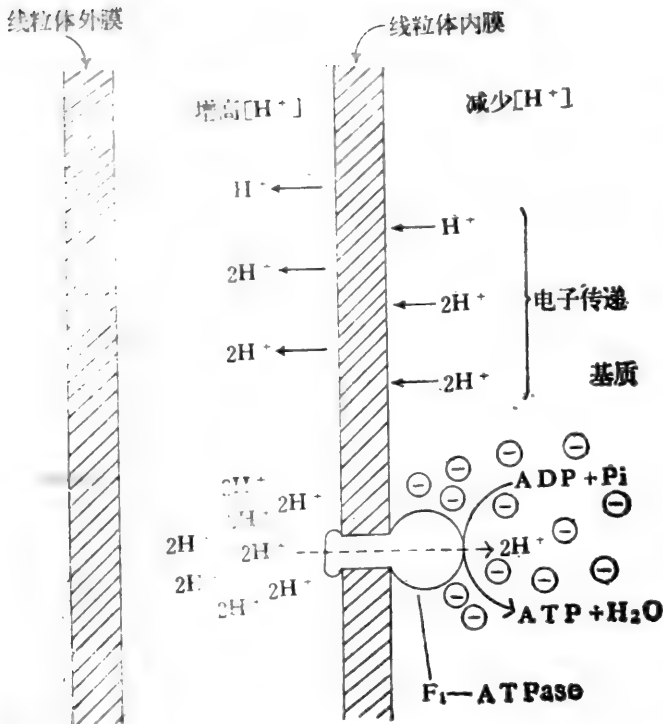


图 8—17 化学渗透假说的原理解释

于 H^+ 的“通道”在 H^+ 浓度梯度的推动下返回到基质中。 H^+ 通过“通道”返回到基质中所释放的自由能推动 ATP 的合成。

上述化学渗透假说的原理可用图 8—17 表示。

从上面所介绍的化学渗透假说的原理，我们可以看出，该学说完全排除对高能化学中间物或高能构象中间物的需要，转而以跨膜的质子梯度作为能量从电子传递到 ATP 合成的能量载体。同时，表明化学渗透假说需要完整的膜结构，否则跨膜的质子梯度不可能存在，这与实验的结果相一致。如果解偶联剂引起跨膜的 H^+ 的渗漏，那么 H^+ 梯度将会被破坏，能

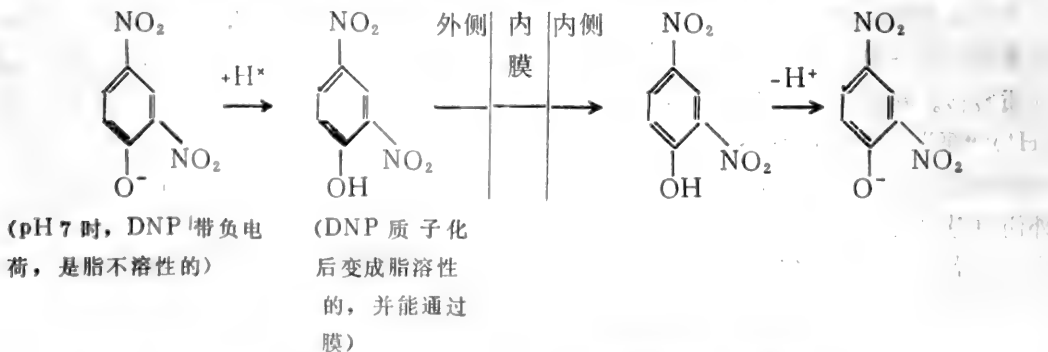


图 8—18 解偶联剂 (DNP) 引起跨膜的 H^+ 渗漏

量偶联就会失败（图 8—18）。我们还可以看到，当电子传递时， H^+ 从线粒体基质的排出和 H^+ 从膜外侧返回是与完整线粒体的总的氧化磷酸速度是一致的。

化学渗透假说为大量的实验所验证。在这一假说的推动下，生物能量学的研究也取得了很大的进展。但是该假说仍有许多疑难问题尚待解决，例如电子传递链是怎样把 H^+ 从内膜内侧的基质中泵到内膜外侧的；跨膜的电化学梯度究竟是如何推动 ADP 和 P_i 合成 ATP 的。

第九章 糖 代 谢

糖类是生物体的重要组成物质之一。自然界中的糖类主要是绿色植物的光合作用产生的。糖类（主要是葡萄糖或淀粉）是异养生物（包括人类、哺乳动物以及异养微生物）生理活动所需能量的主要来源。虽然它们都能合成一些自身特殊的糖类，但糖的来源主要靠食物提供。当糖进入到生物体内后，经过消化、吸收、运转、分解、同化等化学变化，一方面提供自身生命活动所需之能量，另一方面则可以为合成体内其他物质提供碳骨架，并可将经消化吸收的单糖改造成自身的组成物质和能量的贮存物质（例如哺乳动物体内的糖元）。

糖代谢主要是指糖在生物体内的分解代谢和合成代谢。糖的分解代谢是指大分子糖经消化，变成小分子的单糖后，进一步降解、氧化，同时释放出能量等化学变化过程。糖分解代谢的许多中间物是生物体内合成其他物质的碳骨架。糖的分解代谢根据生物所处条件的不同可分为无氧分解和有氧两种类型。

糖的合成代谢是指在体内由简单的小分子物质转变成糖的过程。绿色植物和光合微生物能利用太阳能同化自然界中的 CO_2 合成糖类，并释放出氧气。人及动物则是利用葡萄糖合成糖元，或者由一些非糖物质通过异生作用合成糖元。微生物也能利用各种碳源合成某些糖类。糖的合成代谢是需能反应。

在生物体中，糖代谢不是孤立进行的，是与其他物质的代谢相互联系的，并可以相互转换的。

第一节 糖 酵 解

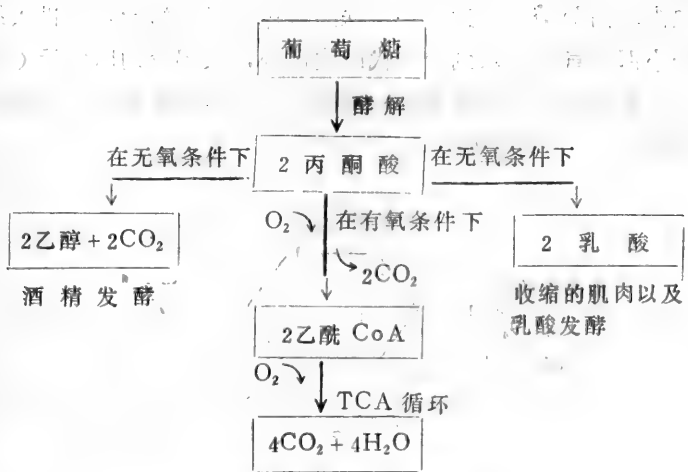
一、糖酵解是糖分解代谢的一条主要途径

生物所需要的能量，主要是靠糖的分解代谢产生。在生物界，大多生物都是需氧的。在有氧的条件下，糖被氧化成 CO_2 和 H_2O ，并产生好氧生物所需要的大量的能量。有些生物例如厌氧微生物只能在无氧的条件下生长；有些生物（例如酵母）或有生物的某些组织（例如高等动物的骨骼肌）能在无氧（或暂时缺氧）的条件下缓慢生长或运动。在这些情况下，生物或生物的某些组织所需能量靠糖的无氧分解代谢提供。

糖酵解是糖分解代谢的最普遍最主要的一条途径，不仅在动物、植物体内存在，而且在许多微生物内也存在。所谓糖酵解(glycolysis)是指葡萄糖(glucose)分子酶促降解成丙酮酸(pyruvate)并伴随产生ATP的过程。该过程是了解得最为清楚的一种代谢途径，丙酮酸生成之后，在不同的条件下、在不同生物（或组织）中，它的归宿是不同的。通过糖酵解途径所生成的丙酮酸有三种主要的去向（图9-1）

第一个去向是在需氧生物中，酵解仅仅构成葡萄糖有氧降解成 CO_2 和 H_2O 的第一阶段。然后，丙酮酸氧化成乙酰-CoA，后者进入到三羧酸循环和电子传递链被完全氧化成 CO_2 。

和 H_2O 。



在动物、植物及许多微生物中
图 9—1 糖酵解产生的丙酮酸的去向

第二个去向是丙酮酸还原为乳酸(Lactate)。哺乳动物的某些组织在缺氧的条件下，例如处在剧烈运动的骨骼肌中，丙酮酸作为电子和氢的受体，被还原为乳酸。由于乳酸是糖在无氧条件下的分解产物。也有把葡萄糖降解成乳酸的过程叫做酵解的情况。在某些厌氧微生物中，乳酸也是糖分解的终产物。厌氧微生物经糖酵解产生乳酸的过程又称乳酸发酵。

哺乳动物的某些组织，即使在有氧存在的情况下，丙酮酸也会转变成乳酸，例如在成熟的红细胞、视网膜组织、肠粘膜等组织中都存在这种情况。红细胞成熟后，不含线粒体，这样就避免了以氧分子作为电子的受体。这对保证红细胞输氧的功能的实现具有特别的意义。

第三条途径是丙酮酸转变成乙醇。某些微生物，例如啤酒酵母，在无氧条件下可以使葡萄糖发酵产生酒精。

糖酵解是第一个被阐明的主要代谢途径，其中许多决定性的工作是由两位德国生物化学家 G. Embden 和 O. Meyerhof 在 30 年代做的。因此糖酵解途径有时也称为 Embden-Meyerhof 途径（简称 E-M 途径）。

二、糖酵解的化学反应

糖酵解从葡萄糖开始到转变成成为丙酮酸，总共包括10个反应步骤。这10个反应步骤可划分成两个反应阶段。

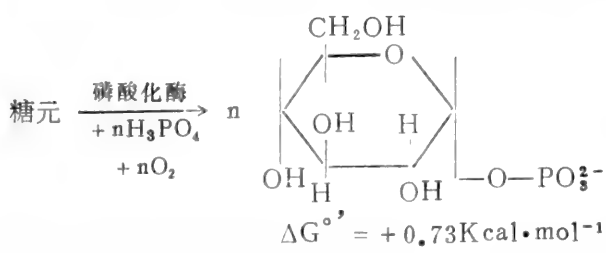
催化糖酵解的酶均存在于细胞液中。这些酶构成了可溶性的多酶体系。

1. 第一阶段

第一阶段包括四个反应步骤，从葡萄糖的磷酸化开始到两分子磷酸丙糖的生成。若从糖元的磷酸解开始，则还多一个反应步骤。

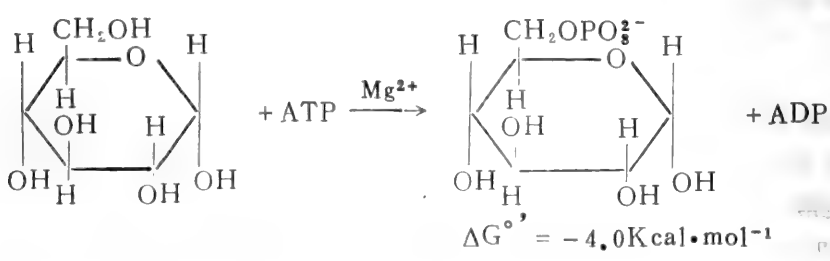
(1)糖元的磷酸解或葡萄糖的磷酸化

当食物中的淀粉经 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶等淀粉水解酶的消化，转变成葡萄糖后，才能吸收进入到细胞内。葡萄糖是通过一种特殊的载体或活性转运系统进入细胞的。葡萄糖进入到细胞后，除一小部分直接进入到分解代谢途径外，大部分则以糖元（肝糖元和肌糖元等）的形式贮存起来。当需要动用糖元提供能量时，便在糖元磷酸化酶的催化下，糖元被磷酸解产生葡萄糖-1-磷酸（Glc-1-P）。



糖元磷酸化酶是控制糖元降解和酵解的关键酶之一。该反应是不可逆的。
Glc-1-P 经磷酸葡萄糖变位酶的催化转变成葡萄糖-6-磷酸（Glc-6-P）。

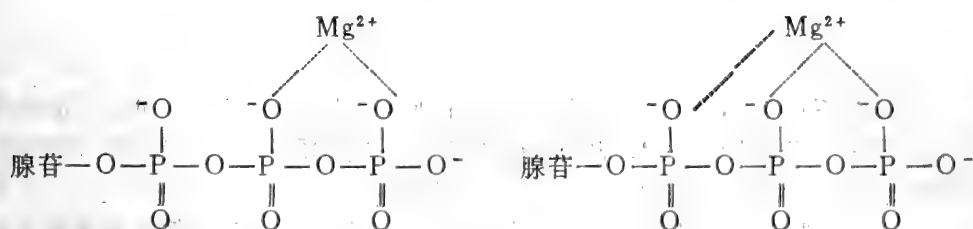
当葡萄糖进入到细胞中后，它的唯一归宿是被磷酸化。葡萄糖磷酸化后作为葡萄糖的活化形式不仅很容易参加代谢转变，而且有利于细胞保持葡萄糖。因为磷酸基是高级性的，能阻止糖分子再次穿越质膜。葡萄糖在己糖激酶（hexokinase）的催化下，由 ATP 提供能量和磷酸基，生成葡萄糖-6-磷酸（Glc-6-P）。此步反应是不可逆的，是糖酵解的关键性步骤之一。



己糖激酶对葡萄糖有很高的亲和力（ $K_m \approx 10^{-5} \text{M}$ ）。己糖激酶能催化多种己糖（包括葡萄糖、果糖、半乳糖、甘露糖等）磷酸化。在哺乳动物细胞内至少存在三种同工酶，它们对葡萄糖有不同的亲和力。己糖激酶也是一种别构酶，它受其产物 Glc-6-P 以及 ATP 抑制。

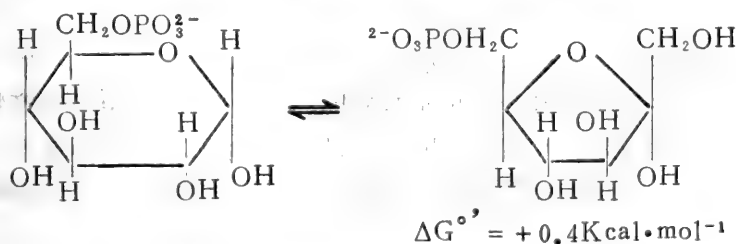
在肝脏中存在有葡萄糖激酶（glucokinase）。该酶对 D-葡萄糖是专一的，但它对葡萄糖的亲和力很低，其 K_m 大约是 10^{-2}M 。这样高的 K_m 表明，该酶只有在葡萄糖浓度很高的情况下才被饱和。葡萄糖激酶的这种性质起着一种很重要的代谢作用。

在生物化学上，磷酸基的转移反应是一种基本的反应。能使磷酸基从 ATP 转移到某受体分子上的酶就叫做激酶（Kinase）。激酶需要二价的金属离子作为辅助因子（通常是 Mg^{2+} ）。二价的金属离子与 ATP 形成复合物。



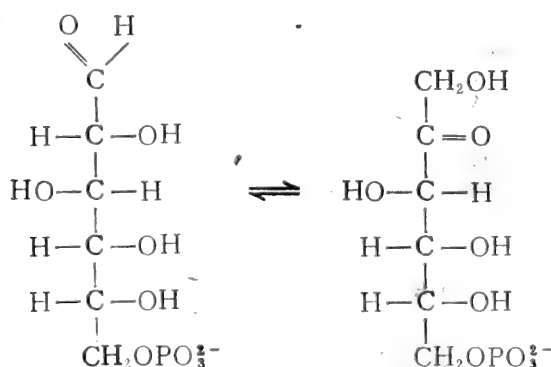
(2) 葡萄糖-6-磷酸转变成果糖-6-磷酸

在 Glc-6-P 分子中, C-1 位上的羰基 (在链状结构中) 或半缩醛 (在环状结构中) 不象羟基那样易于被磷酸化。因此, 这就要涉及一种异构化作用 (isomerization), 即 C-1 位上的羰基转移到 C-2 位上, 即醛糖转变成酮糖。催化 Glc-6-P 转变成果糖-6-磷酸 (Fru-6-P) 的酶是磷酸葡萄糖异构酶。在平衡时, 醛糖和酮糖的比例是 7:3。



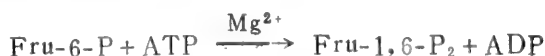
这种转变除为 C-1 位磷酸化作准备外, 也保证了 C-2 位上的羰基的存在。C-2 位羰基的存在是后续裂解反应产生两分子的三碳糖所需要的。

上面的反应用链状结构表示如下:



(3) 果糖-1,6-二磷酸的生成

由于 Glc-6-P 转变成了 Fru-6-P, 故 Fru-6-P 的 C-1 位羟基被磷酸化即成为可能。Fru-6-P 在磷酸果糖激酶 (Phosphofructokinase, 简称 PFK) 的催化下, 由 ATP 提供能量和磷酸基, 转变成果糖-1,6-二磷酸 (Fru-1,6-P₂):



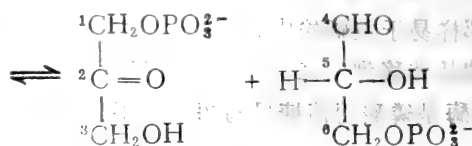
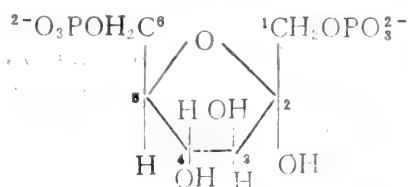
$$\Delta G^{\circ} = -3.4 \text{ Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$$

该酶催化的反应是不可逆的，是酵解途径中最关键的反应步骤（见后述）。但其可在果糖二磷酸酶的催化下重新产生 Fru-6-P。磷酸果糖激酶是一种别构酶，受多种因素的调节。

(4) 磷酸丙糖的生成

Fru-1,6-P₂ 在醛缩酶 (aldolase) 的催化下转变成两分子的磷酸丙糖，3-磷酸甘油醛和磷酸二羟丙酮。

磷酸果糖激酶 (PFK)



$$\Delta G^{\circ} = +5.73 \text{ Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$$

裂解反应在热力学上是不利的，但由于 Fru-1,6-P₂ 的形成是放能的，而且产物 3-磷酸甘油醛在其后的氧化反应中也释放出大量的自由能。因此在一个连续的反应顺序中，热力学上不利的反应可以被热力学上有利的反应所推动（见第八章），上面的反应可以向右进行。

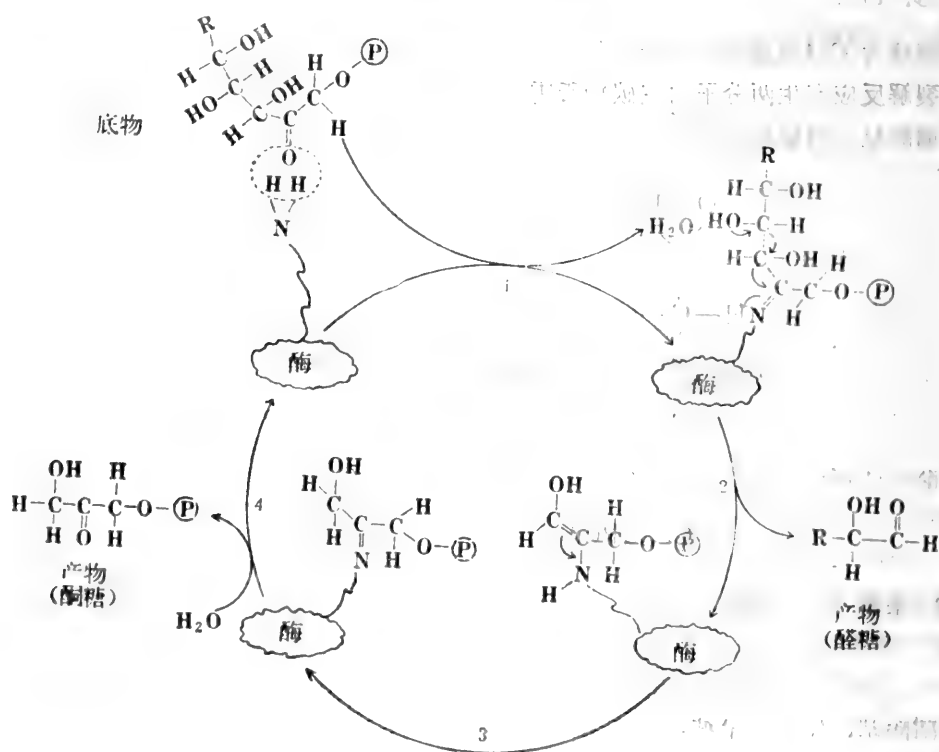
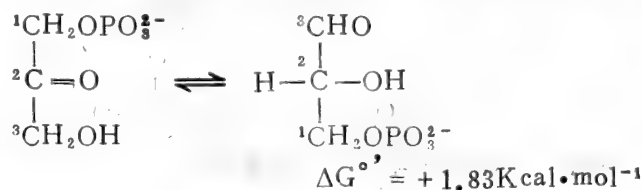


图9-2 类型I醛缩酶的作用机制

有两种类型的醛缩酶,即类型 I 和类型 II。在动物组织中发现的是类型 I,这类醛缩酶是四聚体蛋白。在肝脏、肌肉以及脑组织中都含有不同醛缩酶的同工酶。类型 I 醛缩酶催化反应的机制如图9—2所示。在反应中,涉及希夫氏碱(Schiff's base)在该酶活性中心赖氨酸残基的ε-氨基和底物羰基之间形成。类型 II 醛缩酶只在酵母和细菌中发现,是一类二聚体蛋白。类型 II 醛缩酶需要二价的阳离子(Zn^{2+})作为天然的激活剂,而且在它们的作用机制中不涉及希夫氏碱的形成。

磷酸二羟丙酮和3-磷酸甘油醛是同分异构体,可在磷酸丙糖异构酶的催化下相互转变:



该反应进行得很快,而且是可逆的。在平衡时,96%的磷酸丙糖是磷酸二羟丙酮。但是,由于3-磷酸甘油醛在后续反应中能被有效地移走,所以反应很容易由磷酸二羟丙酮转变成3-磷酸甘油醛。

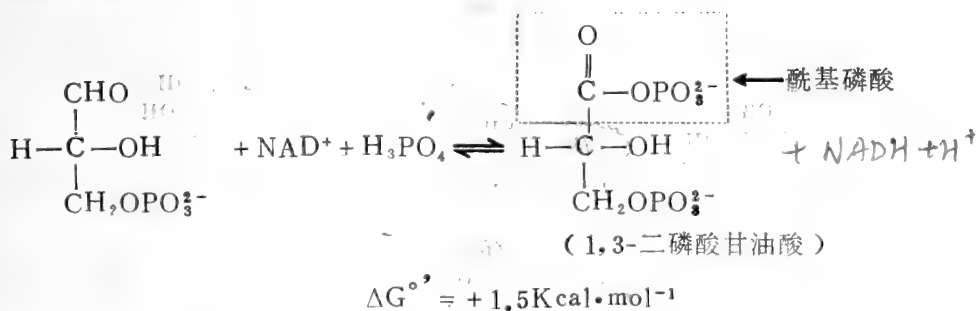
到此步为止,一分子的葡萄糖就转变成了两分子的三碳糖。

2. 第二阶段

第二阶段包括七个反应步骤

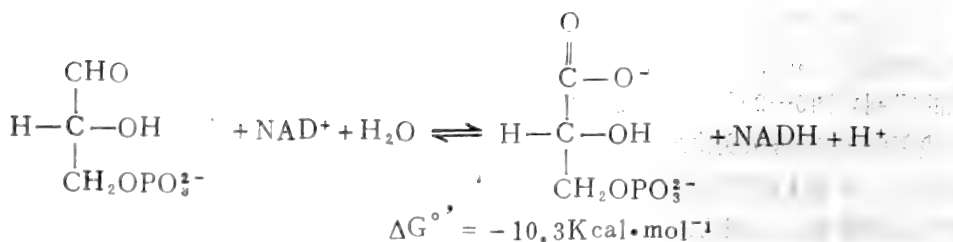
(5) 3-磷酸甘油醛的氧化

3-磷酸甘油醛在3-磷酸甘油醛脱氢酶的催化下,以辅酶 NAD^+ 作为受氢受电子体,并在无机磷酸的参与下,脱氢氧化生成1,3-二磷酸甘油酸。在氧化反应中醛基转变成了超高能量的酰基磷酸(acyl phosphate):

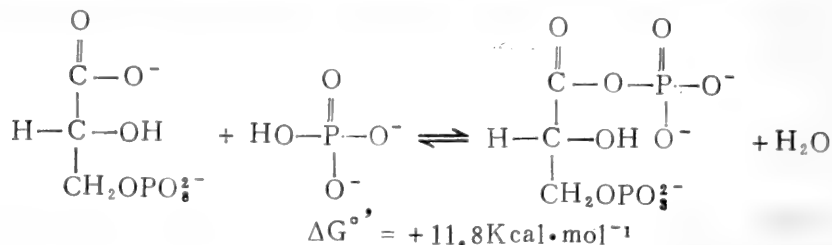


酰基磷酸($\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{P}}-\text{O}^-$)是磷酸和羧酸的混合酐。这种酐(anhydride)形成所需要的能量来自醛基的氧化。

实际上,上述反应是产生能量的反应(氧化)与吸能反应(磷酸化)相偶联的总反应。3-磷酸甘油醛氧化成3-磷酸甘油酸是一个放能反应,可释放出 $10.3 \text{Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 能量:



而3-磷酸甘油酸的磷酸化反应是一个吸能反应，是由上面的放能反应所推动：



合并上述两反应后，总的 $\Delta G^{\circ'} = +1.5 \text{Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。总反应的 $\Delta G^{\circ'}$ 表明，底物和产物（即3-磷酸甘油醛和1,3-二磷酸甘油酸）的浓度将决定体内的反应方向。

3-磷酸甘油醛脱氢酶由四个相同的亚基构成，其活性中心的巯基（—SH）是酶活性所

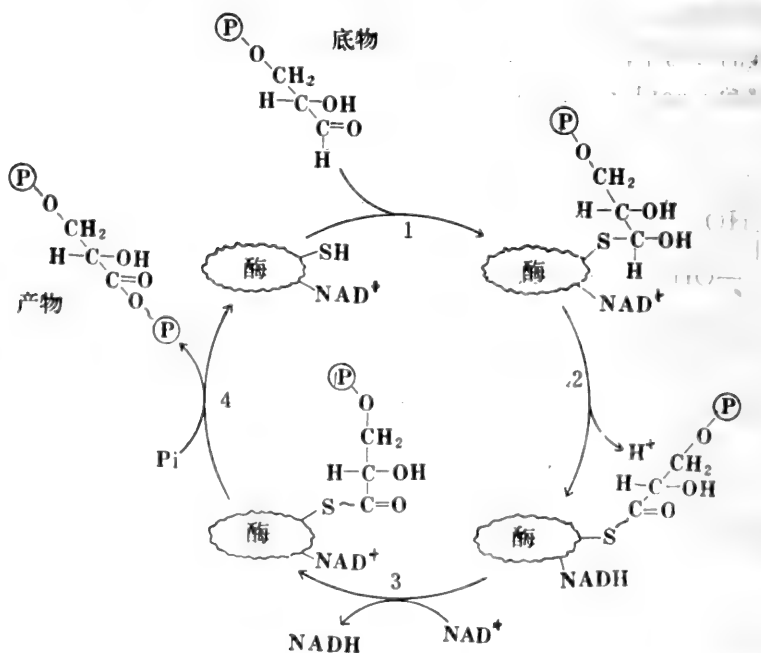
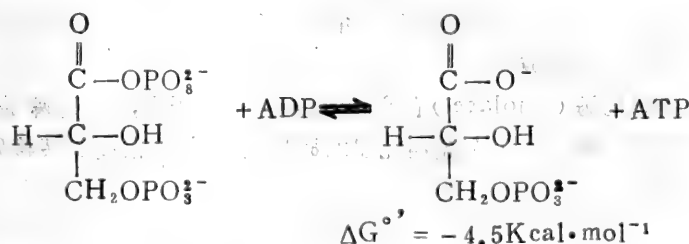


图9-3 3-磷酸甘油醛脱氢酶的作用机制

必需的基团，所以烷化剂（如碘乙酸）和重金属是该酶的有效抑制剂。此外，酶分子的每个亚基结合有 NAD^+ ， NAD^+ 作为该酶的辅酶是该酶的催化反应不可缺少的。3-磷酸甘油醛脱氢酶催化3-磷酸甘油醛的脱氢氧化是一个相当复杂的反应，其反应机制如图9—3所示。首先，酶活性中心的半胱氨酸的巯基（ $-\text{SH}$ ）攻击底物分子上的羰基碳，形成相应的硫代半缩醛（thiohemiacetal）。随即发生氧化作用，将一个氢负离子（两个电子和一个质子）转移到与酶结合的 NAD^+ 上，同时把一个质子释放出来，结果导致高能共价的酰基-酶复合物（硫酯）的形成。然后， NADH 从酶上解离下来， NAD^+ 再结合到酶分子的活性中心。最后，无机磷酸（ Pi ）攻击硫酯形成高能磷酸化合物1,3-二磷酸甘油酸，并从酶分子上游离下来。

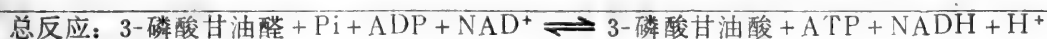
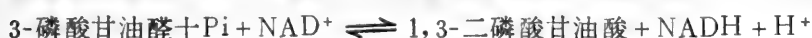
(6) 3-磷酸甘油酸和 ATP 的生成

1,3-二磷酸甘油酸（1,3-DPG）在磷酸甘油酸激酶的催化下，将高能磷酸基从1,3-二磷酸甘油酸的酰基磷酸上转移给 ADP ，从而生成了3-磷酸甘油酸和 ATP 。



1,3-二磷酸甘油酸水解时可以释放出 $11.8 \text{Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 的自由能（ $\Delta G^{\circ'} = -11.8 \text{Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ ），足以推动一分子的 ATP 生成。一分子的葡萄糖氧化至此可生成两分子的 ATP 。

磷酸甘油酸激酶和3-磷酸甘油醛脱氢酶所催化的反应构成了一个能量偶联过程：

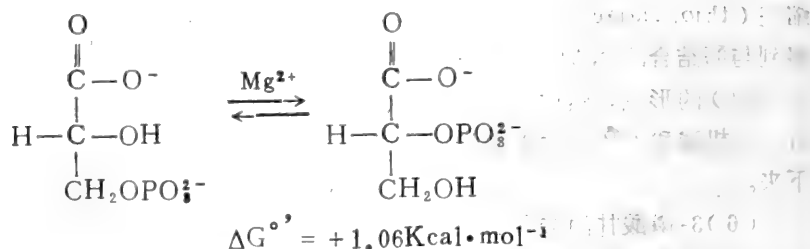


$$\Delta G^{\circ'} = -3.0 \text{Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$$

从上面的反应我们可以看出，1,3-二磷酸甘油酸是这两步反应的高能偶联中间物。这里就引出了一个新的概念，即底物水平磷酸化（substrate-level phosphorylation）。所谓底物水平磷酸化是指在底物氧化的基础上生成 ATP 的过程。底物水平磷酸化与氧化磷酸化是不同的。底物水平磷酸化是直接代谢途径的某个特殊反应偶联，而氧化磷酸化是电子沿呼吸链传递所产生的质子推动力造成的。

(7) 2-磷酸甘油酸的生成

这是一步分子内的重排反应。在磷酸甘油酸变位酶 (phosphoglyceromutase) 的催化下, 底物分子中的磷酸基发生可逆的移位反应, 即3-磷酸甘油酸与2-磷酸甘油酸的互相转变。

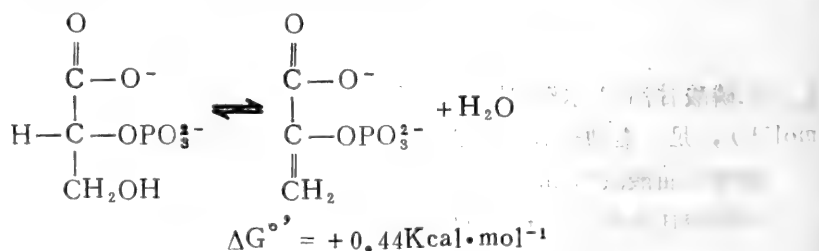


该反应需要 Mg^{2+} , 而且还涉及2,3-二磷酸甘油酸中间物的形成。从这个反应可以看出, 变位酶 (mutase) 是一类能催化分子内化学基团移位反应的酶。

这个反应由于后续反应是高度放能的, 所以能朝2-磷酸甘油酸生成的方向进行。

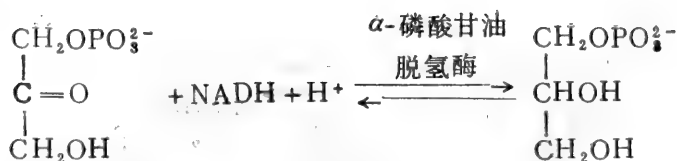
(8) 磷酸烯醇式丙酮酸的生成

2-磷酸甘油酸在烯醇化酶 (enolase) 的催化下脱去一分子水, 生成磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP)。磷酸烯醇式丙酮酸含有一个超高能量的磷酸基, 具有很高的转移磷酸基的势能。该反应需要 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 。



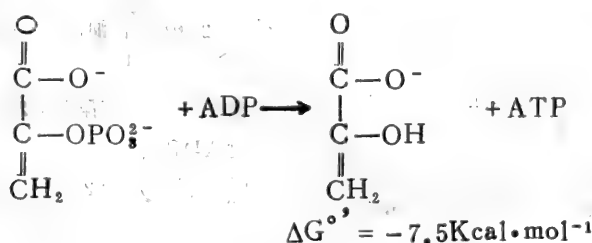
当磷酸烯醇式丙酮酸水解时, 可以释放出很高的自由能 ($\Delta G^{\circ'} = -14.8 \text{Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$)。这是因为在烯醇化酶的催化下, 底物分子内部的 C-2 和 C-3 位分别发生了氧化和还原。这只要比较底物和产物的结构就很容易理解。产物磷酸烯醇式丙酮酸在热力学上是一种高度不稳定的形式, 具有强烈的由烯醇式转变成酮式的趋势。酮式结构在热力学上是比较稳定的。但是, 由于磷酸烯醇式丙酮酸的 C-2 位上有磷酸基的存在, 烯醇式转变成酮式的趋势被“卡住”。

烯醇化酶在与底物结合之前先与 Mg^{2+} 结合成复合物。该酶在氟离子 (F^-) 和磷酸盐同时存在下失去活性, 因为氟离子与磷酸基形成的氟磷酸离子能结合 Mg^{2+} , 所以氟化物是烯醇化酶的有效抑制剂。若在酵解途径中加入氟化物, 必然造成磷酸甘油酸以及磷酸甘油积累。由于反应被抑制, 后续过程不能继续进行, 反应 (5) 生成的 NADH 没有受氢体, 于是转而迫使磷酸二羟丙酮作为受氢体还原为磷酸甘油。



(9) 烯醇式丙酮酸和 ATP 的生成

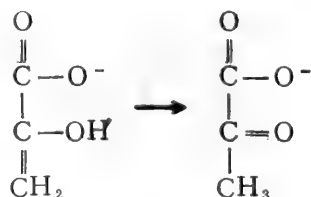
上述生成的磷酸烯醇式丙酮酸由于具有很高的转移磷酸基的势能，所以在有 ADP、 Mg^{2+} 以及高浓度 K^+ 存在下经丙酮酸激酶的催化，可将其高能磷酸基转移到 ADP 上，生成 ATP 和烯醇式丙酮酸：



逆反应只有正反应速度的 0.2%，所以实际上该反应是不可逆的。至此，一分子的葡萄糖经酵解途径又可以生成两分子的 ATP。这一反应是底物水平磷酸化的又一个例子。在反应中， K^+ 可能对磷酸烯醇式丙酮酸的羧基起稳定作用，增高酶对底物的亲和力。

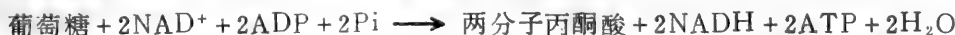
(10) 丙酮酸的生成

由于烯醇式具有强烈的转变成酮式的趋势，所以，烯醇式丙酮酸不需要酶的催化即可转变成丙酮酸。



3. 糖酵解小结

由葡萄糖或糖元经酵解转变成丙酮酸的全过程如图 9—4 所示，其总反应是：



糖酵解的第一阶段是糖链裂解的过程，也是消耗能量的反应。若酵解从糖元开始，则消耗 1 分子的 ATP；若从葡萄糖开始，则消耗 2 分子的 ATP。第二阶段是产生能量的反应。每个葡萄糖单位经此阶段可以产生 4 分子的 ATP。因此，整个酵解过程可以净产生二分子的 ATP（从葡萄糖开始）或三分子 ATP（从糖元开始）。

在糖酵解的整个反应顺序中，有的是吸能反应，有的是放能反应，但由于整个过程是放能的，因此，可以推动总的反应顺序向丙酮酸生成的方向进行。

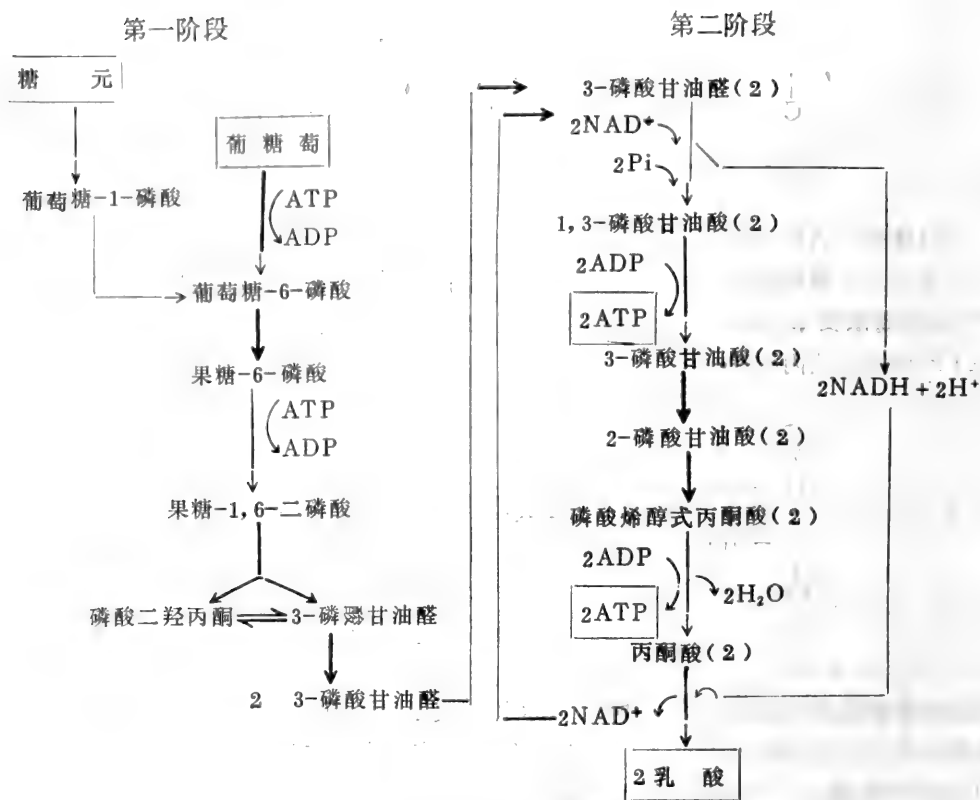


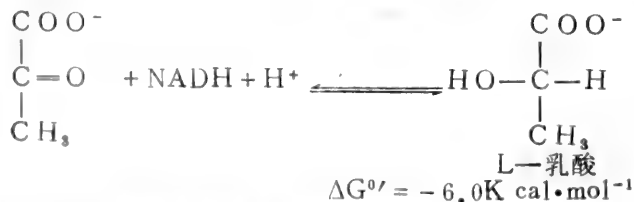
图9-4 糖酵解的过程及乳酸的生成

三、在无氧条件下丙酮酸的去向

1. 乳酸的生成

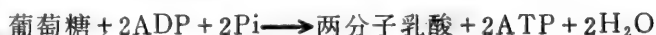
正常人在休息时，所需要的能量主要是通过糖的有氧分解途径获得的（见第二节）。但是，在运动时，心肌对 ATP 的需要量突然升高10倍，骨骼肌对 ATP 的需要量增加100倍以上。这些紧急需要的部分不可能完全通过有氧分解来提供，因为它受到氧和葡萄糖供应的限制。在这种情况下，骨骼肌不象心肌那样容易得到氧，所需能量必须靠糖在无氧下的酵解途径产生，以补充能量的不足。

在缺氧的条件下，葡萄糖经酵解途径产生的丙酮酸，在乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase)的催化下，利用反应(5)生成的 NADH 使丙酮酸还原生成乳酸。由于反应是放能的，所以该酶催化的反应有利于乳酸的生成。



从第六章，我们已经知道，乳酸脱氢酶是一种四聚体蛋白，具有五种同工酶。所有这些同工酶都能催化上面的反应。但是，这些同工酶对底物（尤其是对丙酮酸）具有不同的 K_m ，并

且对丙酮酸造成的别构抑制的敏感性也不相同。心脏型的乳酸脱氢酶(B_4 或 H_4)对丙酮酸的 K_m 高(即亲和力低), 并且少量的丙酮酸即可对它造成抑制。骨骼肌型乳酸脱氢酶(A_4 或 M_4)对丙酮酸的 K_m 低(即亲和力高), 并且不受丙酮酸的抑制。乳酸脱氢酶同工酶的这种特性与心肌和骨骼肌所起的作用和所处的生理条件是一致的。心肌需要不停的工作以充分保证氧的供应, 所以, 需要的能量是从三羧酸循环中得到的(见下一节)。当需要大量的能量时, 丙酮酸经酵解加速生成; 只要达到一定的浓度即可以对心脏型乳酸脱氢酶造成抑制, 使丙酮酸不能形成乳酸, 而使其进入三羧酸循环而被继续氧化。骨骼肌不象心肌那样能够及时地获得大量的氧气, 特别是当骨骼肌运动时, 所需要的能量主要靠无氧(缺氧)条件下的酵解途径供给。此时, 丙酮酸大量生成, 并通过骨骼肌型乳酸脱氢酶催化, 使丙酮酸生成乳酸, 同时使反应(5)生成的 $NADH$ 氧化, 重新生成 NAD^+ , 从而刺激酵解的进行。胞液中的 NAD^+ 是有限的, 如果它被还原后($NADH$)不能在后续的反应中重新产生, 必定会影响整个反应的进行。乳酸生成的总反应是:



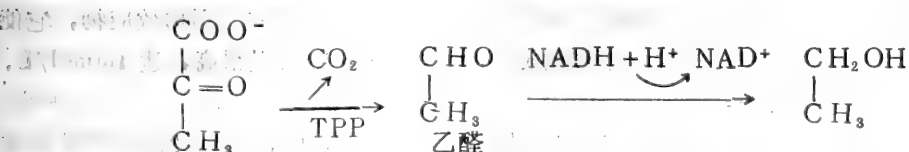
肌肉在剧烈运动时, 会有乳酸的积累。乳酸通过扩散, 透过质膜, 并经血液到达肝脏, 在肝脏中重新转变成丙酮酸。然后, 或是进入有氧分解途径继续被氧化, 或是沿糖异生途径重新生成葡萄糖或合成糖元(见后述)。

在工业上, 可以利用乳酸产生菌, 将葡萄糖加入到培养液中进行发酵, 生产乳酸。

2. 酒精发酵

糖酵解的机制的研究主要是利用酵母无细胞抽提液进行的。因为酵母无细胞抽提液含有糖酵解的全部酶类和辅助因子。酵母或其他某些微生物的酒精发酵所经历的化学反应过程与酵解途径相同。由于酵母细胞内不含有磷酸化酶, 故不能直接利用淀粉进行发酵, 必须先加入淀粉酶使淀粉水解成麦芽糖和葡萄糖。酵母细胞产生的麦芽糖酶可使麦芽糖进一步水解成葡萄糖。

葡萄糖进入酵母细胞后, 经酵解途径转变成丙酮酸。后续过程与乳酸的生成不同。丙酮酸在酵母细胞内的丙酮酸脱羧酶(decarboxylase)和乙醇脱氢酶(ethanol dehydrogenase)的催化下最终生成酒精:



丙酮酸脱羧酶需要焦磷酸硫胺素(TPP)作为辅酶, 其脱羧反应机制已在“维生素”一章中作了介绍。 $NADH$ 的来源是酵解的第五步反应产生的。 NAD^+ 的重新生成同样会大大刺激发酵的进行。

酒精发酵的总反应是: 葡萄糖 + $2ADP + 2P_i \longrightarrow$ 两分子的酒精 + $2CO_2 + 2ATP + 2H_2O$

乳酸的生成和酒精发酵都是在无氧条件下进行的。所以, 由葡萄糖在无氧或缺氧条件下生成乳酸、或酒精、或其他产物的过程统称为无氧分解、或无氧酵解、或发酵(fermentation)。

糖酵解是生物或生物的某些组织获取能量的最基本的方式, 因为它能保证生物在无氧或

暂时缺氧的情况下维持生命活动所必需的能量供应。

四、其他糖类的分解代谢

如上所述，糖元和淀粉都可以降解成葡萄糖进入到酵解途径中。除糖元、淀粉和葡萄糖外，还有一些糖如麦芽糖、乳糖、蔗糖等双糖，以及果糖、半乳糖和甘露糖等单糖都可以被生物利用。这些糖经过相应的变化都可以进入到酵解途径中去。

在动物体内，双糖在吸收利用前必须在小肠内经酶促水解转变成单糖才能被小肠吸收。然后经血液进入到肝脏，在肝脏细胞中被磷酸化，并转变成酵解的中间物而进入酵解反应顺序（图9—5）。

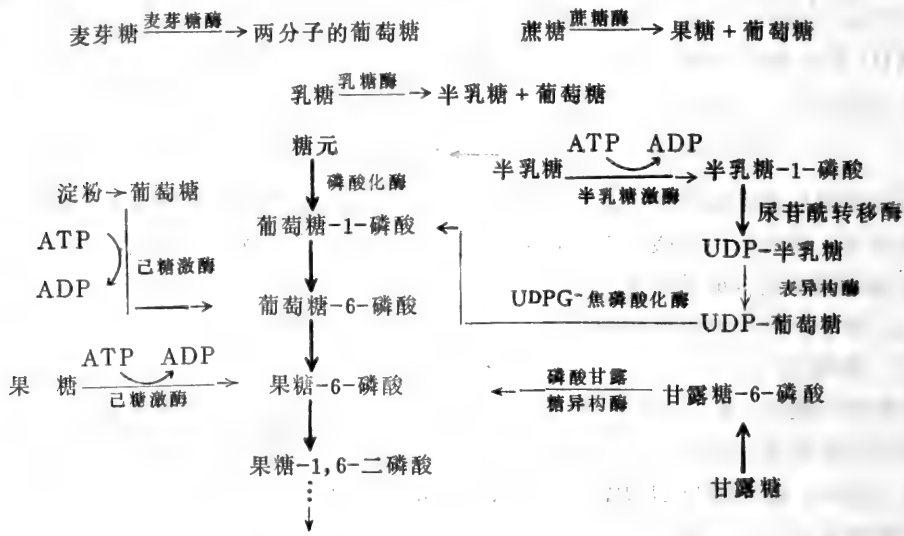
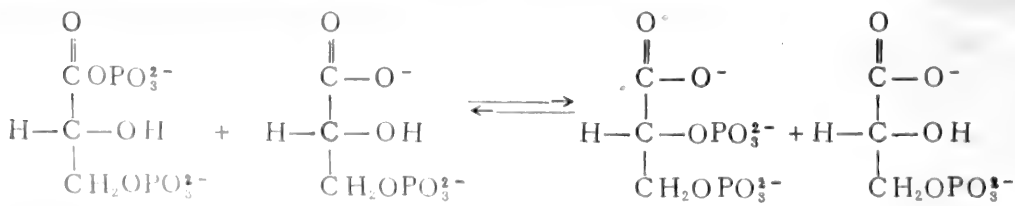


图9—5 不同的己糖转变成糖酵解中间物的过程

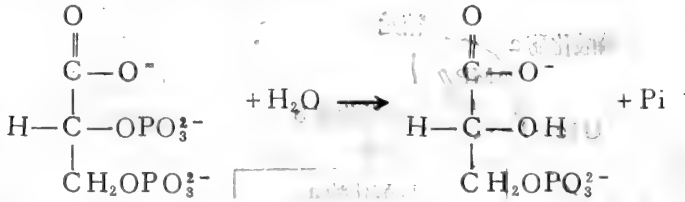
五、2, 3-二磷酸甘油的代谢

前面曾提到，在3-磷酸甘油酸经磷酸甘油酸变位酶催化转变成2-磷酸甘油酸时涉及辅助因子2, 3-二磷酸甘油酸。2, 3-二磷酸甘油酸(2, 3-DPG)是血红蛋白的别构效应物，它能降低血红蛋白对氧的亲合力(第三章)。在红细胞中，2, 3-DPG的含量很高，达4mmol/L，而在其他组织中只是痕量存在。

糖酵解的中间物1, 3-二磷酸甘油酸(1, 3-DPG)和3-磷酸甘油酸是合成2, 3-DPG的前体，在二磷酸甘油酸变位酶(diphosphoglycerate mutase)的催化下，将1, 3-DPG的C-1位上的磷酸基转移到2-磷酸甘油酸的C-2位上，生成2, 3-DPG。



在2,3-二磷酸甘油酸磷酸酶的催化下,2,3-DPG的C-2位上的磷酸酯键被水解,产生3-磷酸甘油酸。磷酸酶是一种催化磷酸酯水解的酶。



在二磷酸甘油酸变位酶催化的反应中,2,3-DPG是1,3-DPG的强有力的竞争性抑制剂。因此,2,3-DPG的合成速度部分地取决于它自身的浓度。另一个控制因素是1,3-DPG的浓度,因为这个变位酶通常不为1,3-DPG所饱和。与此相反,在红细胞中,3-磷酸甘油酸的浓度接近于使该酶饱和。这就是说,在红细胞中,糖酵解的中间物1,3-DPG直接关系到血红蛋白的生理功能。因此,涉及糖酵解的代谢失调会影响血红蛋白对氧的亲合力。

六、糖酵解的调节

六、糖酵解的调节

无论是在无氧还是在有氧的条件下,糖酵解都是糖分解代谢的一条主要途径。糖酵解的速度主要取决于两方面的需要,一是细胞对能量(ATP)的需要,另一个是细胞对糖分解代谢中间物的需要。因为后者是糖与其他物质相互转变的纽带。

在糖酵解的整个反应顺序中,有三种酶催化的反应是不可逆的,它们分别由磷酸化酶(糖元降解)或己糖激酶(葡萄糖的磷酸化),磷酸果糖激酶以及丙酮酸激酶所催化。因此,这三种酶是处在糖酵解途径中的控制部位,它们调节糖酵解的速度(图9-6)。

1. 己糖激酶和葡萄糖激酶

己糖激酶催化葡萄糖磷酸化生成葡萄糖-6-磷酸。这是游离的葡萄糖进入糖酵解反应顺序的第一步反应,也是一步关键性的反应。在哺乳动物体内至少存在己糖激酶的三种同工酶。虽然不同的组织可能以某种类型的己糖激酶占优势(例如在脑中是类型I,在肌肉中是类型II),但是,除肝脏外,所有组织几乎都同时含有这三种同工酶。这些同工酶都表现出了很相似的动力学特征:对葡萄糖的亲合力很高。己糖激酶也是一种别构酶,它受到它的产物葡萄糖-6-磷酸(Glc-6-P)的别构抑制。在肌肉中,当Glc-6-P的浓度有重要的升高时,表明Glc-6-P利用的速度不如形成它的速度。于是,己糖激酶就受到它的产物Glc-6-P的抑制,以阻止Glc-6-P的进一步形成。

在肝脏中,含有大量的葡萄糖激酶。该酶的专一性很高,而且不被Glc-6-P抑制,但它对葡萄糖的 K_m 很高。葡萄糖激酶的主要作用是肝脏糖元的合成提供Glc-6-P,Glc-6-P可转变成Glc-1-P,以糖元的形式贮存在肝脏中。当血糖(葡萄糖)浓度升高时,就分泌胰岛素,胰岛素能刺激葡萄糖激酶的合成,使血糖进入肝细胞后被磷酸化,从而降低血糖的浓度。只有当超过肝脏贮存糖元的能力时,葡萄糖磷酸化后才沿糖酵解途径被降解。

2. 糖元磷酸化酶

糖元磷酸化酶(Glycogen phosphorylase)是催化糖元降解和酵解的第一个酶,它也

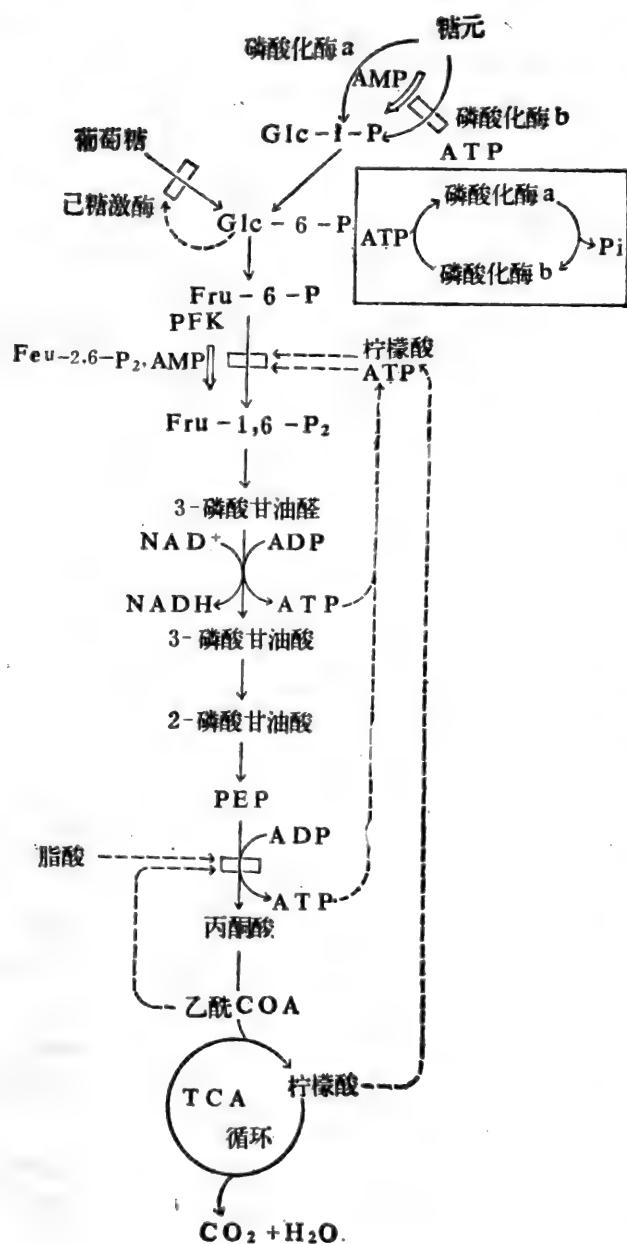


图9—6 糖酵解的调节

双线箭头表示促进，虚线箭头指向的长条块表示反馈抑制的进行。但是，磷酸化酶 a 则不受 AMP 的刺激。

综上所述,肌肉中肌糖元磷酸化酶受两种不同的机制调节,一是通过磷酸化与去磷酸化的共价调节,这种调节方式受激素控制;另一个是非共价的别构调节,这种调节方式是在激

在肌肉中，磷酸化酶以两种形式存在，即有活性的、磷酸化的酶 a 和低活性的、去磷酸化的酶 b。来自骨骼肌的磷酸化酶由两个相同的亚基组成。磷酸化的部位是在每个亚基的第14位丝氨酸残基上。在磷酸化酶 b 激酶的催化下，磷酸化酶 b 被磷酸化，转变成有活性的磷酸化酶 a。磷酸化酶 a 在磷酸化酶 a 磷酸酶的催化下除去磷酸基，又转变成了低活性磷酸酶 b（图6—25）。然而，磷酸化酶活性的这种变化最终受激素的调节（见第七章）。

当肾上腺素或胰高血糖素达到肝脏时,磷酸化酶被激活(“a”形式),促进肝糖元降解,从而升高血糖的水平。当肾上腺素到达肌肉时,磷酸化酶也被激活(“a”形式),使肌糖元降解,并促进酵解的进行。

肌肉中的磷酸化酶的活性亦受别构调节。别构因素是[AMP][ATP] 的比例的变化。当肌肉细胞中的AMP 水平升高时,意味着需要通过酵解提供能量,因而需要加快酵解的进行。这是通过激活磷酸化酶 b 而实现的。AMP 是磷酸化酶 b 的别构激活剂。当ATP 的水平升高时,说明细胞内能量充足,再合成它则是多余的,因而ATP 就作为一种别构抑制剂对磷酸化酶 b 造成抑制,从而降低或抑制酵解

素诱导的“a”形式缺乏的情况下，通过[AMP]/[ATP]浓度比例的变化实现的。

在肝脏中，糖元磷酸化酶也有 a 和 b 两种形式，其主要功能与肌肉中的磷酸化酶相似，但在结构和调节特性方面稍有差别。在肝脏中，糖元磷酸化酶降解糖元的目的是为了升高血糖的水平（见图7—18）。

3. 磷酸果糖激酶(PFK)

上述机制只涉及游离的葡萄糖或糖元的糖残基进入酵解反应顺序的调节，还不是糖酵解途径本身最关键的调节部位。在酵解反应顺序中，最关键的调节部位（或限速步骤）是磷酸果糖激酶催化的反应。磷酸果糖激酶是一种相当复杂的别构调节酶。在肌肉组织中，磷酸果糖激酶受多种效应物的调节。Fru-6-P、AMP 以及 Fru-1, 6-P₂ 是它的重要激活剂；ATP 和柠檬酸是它的有效抑制剂。然而磷酸果糖激酶的活性调节涉及诸因素的相互作用。当由于活跃的肌肉收缩而耗去大量的 ATP 时，ATP(PFK 的底物)处在低水平，表明细胞需要产

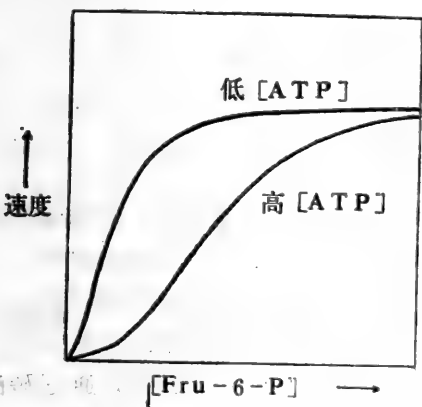


图9—7 ATP 和 Fru-6-P 对 PFK 反应速度的影响

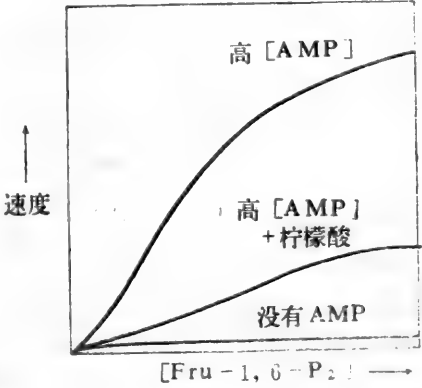


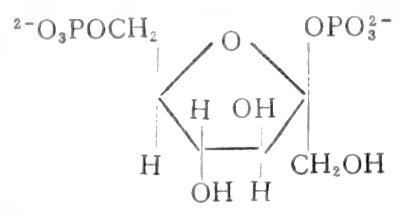
图9—8 AMP、柠檬酸和 Fru-1, 6-P₂ 对 PFK 反应速度的影响

生能量，酵解必须加速进行。所以，即使 Fru-6-P 浓度很低，磷酸果糖激酶的活性仍然升高（图9—7）。但是，当细胞已获得高水平的 ATP 时（休息时），ATP 则对磷酸果糖激酶造成强烈的抑制，使磷酸果糖激酶对底物 Fru-6-P 的亲合力降低，只有当 Fru-6-P 的浓度很高时才有产物的生成。柠檬酸是三羧酸循环的中间物，高水平的柠檬酸能有效地抑制磷酸果糖激酶的活性，并且可以加强 ATP 对该酶的抑制作用。与此相反，当肌肉活跃收缩时，AMP 的浓度显著升高。高水平的 AMP 能增高磷酸果糖激酶对 Fru-6-P 的亲合力，从而刺激酵解的进行（图9—8）。因此，在肌肉组织中，当 ATP、柠檬酸处在高水平时，表明细胞再进行酵解反应则是多余的，因而对酵解造成抑制。当细胞需要能量和需要提供合成柠檬酸的前体时，磷酸果糖激酶的活性受到刺激，酵解反应因此而得到加强，其信号是 [AMP]/[ATP] 的比例升高，柠檬酸水平降低。

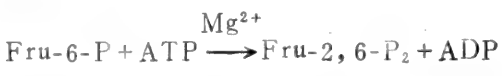
在肝脏中，磷酸果糖激酶除受上述效应物调节外，近年来发现还有一种更重要的正调节效应物——果糖-2, 6-二磷酸(Fru-2, 6-P₂)。Fru-2, 6-P₂ 能大大降低磷酸果糖激酶的 K_m。许多研究者比较了 Fru-2, 6-P₂、AMP、Fru-1, 6-P₂ 等正效应调节物对磷酸果糖激酶

的激活效应, 认为 Fru-2, 6-P₂ 是该酶最有效的激活剂。更有意义的是, Fru-2, 6-P₂ 能降低磷酸果糖激酶对 AMP 的 K_m。这表明 Fru-2, 6-P₂ 和 AMP 能协同激活磷酸果糖激酶。Fru-2, 6-P₂ 也具有解除 ATP 以及柠檬酸对磷酸果糖激酶的抑制的作用。

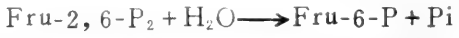
果糖-2, 6-二磷酸的结构如下所示:



它是由果糖-6-磷酸-2-激酶(PFK₂)催化合成的:



Fru-2, 6-P₂ 也可在果糖-2, 6-二磷酸酶(FBPase2)的催化下降解:



现在的研究表明, PFK₂ 和 FBPase2 是具有两种酶活性的同一种酶蛋白, 即该酶蛋白是一种双功能酶, 具有催化 Fru-2, 6-P₂ 合成与降解的能力。

果糖-2, 6-二磷酸在其他组织中也存在, 它在不同组织中所起的作用可能不同。

为什么是磷酸果糖激酶而不是己糖激酶是酵解的最关键的调节酶呢? 因为 Glc-6-P 不仅是酵解的中间物, 而且也是转变成糖元的中间物; 此外, Glc-6-P 还可以通过磷酸己糖支路被氧化。只有对酵解途径是专一的第一个不可逆反应即 Fru-6-P 转变成 Fru-1, 6-P₂ 的反应才是最重要最关键的步骤。因此, 磷酸果糖激酶是酵解反应顺序中的 最关键的调节酶。一般来说, 在一代谢途径中, 催化最关键的反应步骤的酶才是最重要最关键的调节酶。

4. 丙酮酸激酶

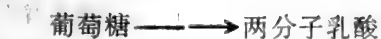
丙酮酸激酶也是酵解途径中的一种调节酶。该酶是一种别构酶, 同样也具有几种同工酶。在肌肉和肝脏中, 当有高浓度的 ATP 存在时, 丙酮酸激酶的活性受到抑制, 磷酸烯醇式丙酮酸转变成丙酮酸的反应受阻。丙酮酸激酶也可被乙酰 CoA 以及长碳链脂酸抑制。因为足够量的燃料分子(乙酰-CoA 和脂酸)用于能产生大量能量的三羧酸循环, 此时酵解反应继续进行则是浪费, 故酵解被抑制。

此外, 3-磷酸甘油醛脱氢酶也是一种别构酶, 它的活性受 NAD⁺ 的刺激。当细胞内的 NAD⁺ 水平升高时, 3-磷酸甘油醛脱氢酶的活性升高, 酵解反应的速度也预期会升高。

第二节 三羧酸循环

在无氧的条件下, 每分子葡萄糖经酵解途径转变成乳酸时所释放出来的化学能是很少的。但在有氧的条件下, 每分子葡萄糖完全氧化成 CO₂ 和 H₂O, 可以释放出大量的化学

能。



$$\Delta G^{0'} = -47.0 \text{ Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$$



$$\Delta G^{0'} = -686 \text{ Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$$

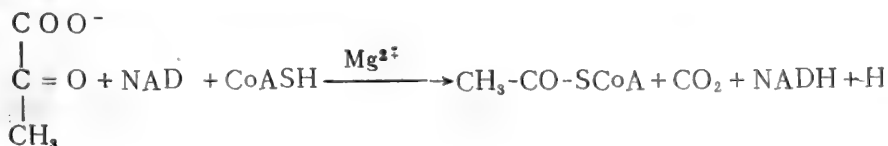
可见，糖的无氧分解产物中还蕴藏着极为丰富的能量，乳酸分子还含有葡萄糖分子93%的可利用的能量。

如前所述，葡萄糖经酵解途径生成丙酮酸后，在有氧的条件下，可进入一个循环途径——三羧酸循环。这是葡萄糖分子完全氧化的一条主要途径。（在后续有关章节中，我们将会看到，三羧酸循环也是其他燃料分子完全氧化的一条主要途径。）

在有氧的条件下，糖分子完全氧化成 CO_2 和 H_2O 的过程可分为三个阶段。第一阶段是糖酵解。第一阶段所包括的反应，在真核生物中是在胞液中进行的。第二阶段是丙酮酸氧化成乙酰 CoA 的过程。第三阶段是乙酰 CoA 被完全氧化的过程。在真核生物中，第二阶段和第三阶段是在细胞的线粒体中进行的，在细菌中，则是在胞液中进行的。每一个阶段都伴随有能量的产生，但尤以第三阶段最多。

一、丙酮酸氧化脱羧生成乙酰 CoA

糖酵解产生的丙酮酸在丙酮酸脱氢酶复合物的催化下，产生乙酰 CoA 和 CO_2 。该酶复合物催化的总反应是：



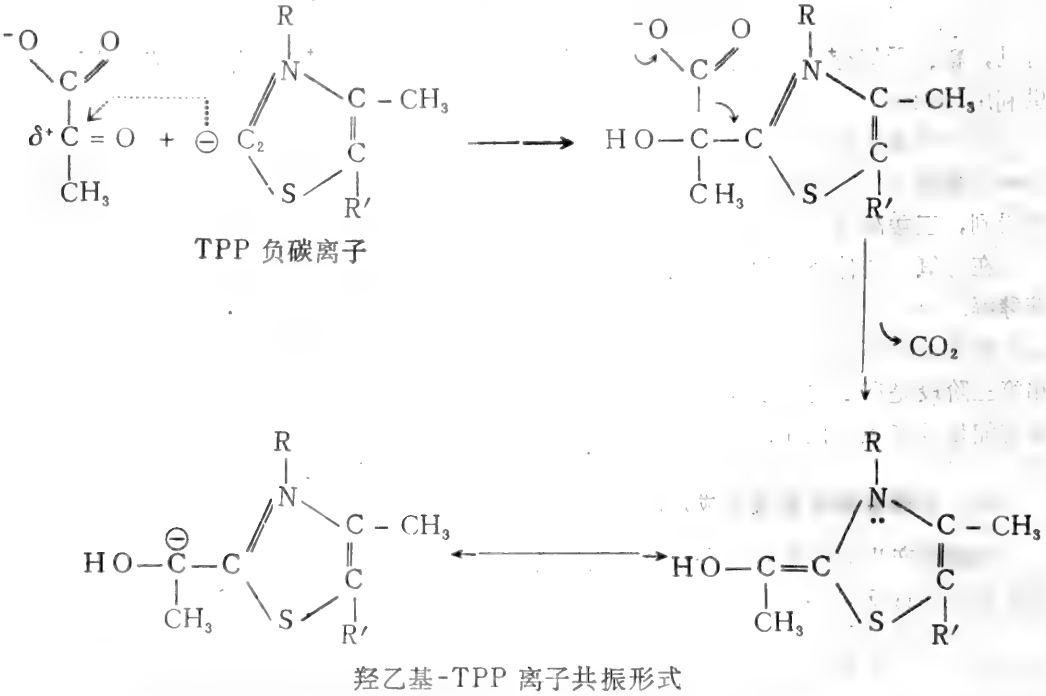
$$\Delta G^{0'} = -8.0 \text{ Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$$

在真核生物中，丙酮酸脱氢酶复合物位于线粒体基质中；而在原核生物中，这个酶复合物是在胞液中。

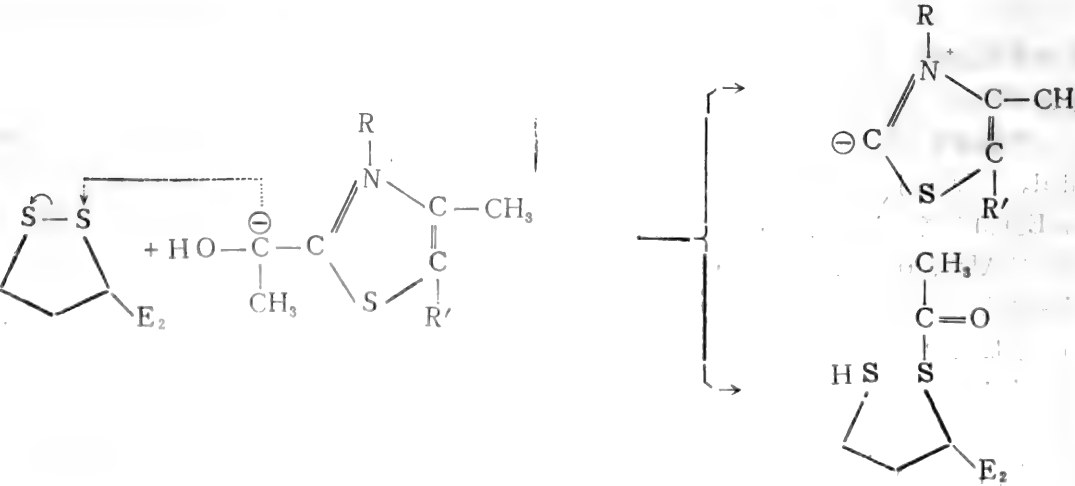
丙酮酸脱氢酶复合物是由三种不同的酶和五种不同的辅酶或辅基所组成的结构化的多酶组织。三种不同的酶是丙酮酸脱氢酶(E_1)（有时也叫做丙酮酸脱羧酶）、二氢硫辛酰转乙酰基酶(E_2)和二氢硫辛酰脱氢酶(E_3)。五种辅酶或辅基是焦磷酸硫胺素(TPP)、黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)、辅酶 A(CoA-SH)、菸酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)以及硫辛酸。这些辅助因子的结构和作用机制已在“维生素”一章中作了介绍。来自大肠杆菌的丙酮酸脱氢酶复合物的分子量大约是 4.6×10^6 。在这个酶复合物结构中，每个酶组分都由多个亚基组成。二氢硫辛酰转乙酰基酶(E_2)处在“核心”部位，该酶由24个亚基构成，每个亚基的活性中心的赖氨酸残基上的 ϵ -氨基以酰胺键共价地连接一个硫辛酸，作为该酶的辅基。与这个“核心”连接的是由12个二聚体(24条肽链)构成的丙酮酸脱氢酶和由6个二聚体(12条肽链)构成的二氢硫

辛酰脱氢酶。丙酮酸脱氢酶含有结合的辅酶 TPP, 二氢硫辛酰脱氢酶含有结合的辅基 FAD。在这个很大的复合物中, 同核心酶(E₂)共价结合的长长的硫辛酰赖氨酸基作为“摆动臂”, 能把氢原子和乙酰基从丙酮酸脱氢酶复合物的一个酶分子转移到另一个酶分子上(图9-9)。

在丙酮酸脱氢酶复合物催化的复杂反应中, 第一步反应是由丙酮酸脱氢酶催化的, 产生 CO₂ 和 E₁-TPP-羟乙基复合物。在这个反应中, TPP 噻唑环 C-2 位上的氢被解离, 所形成的 TPP 负碳离子在亲核加成反应中起了关键的作用。

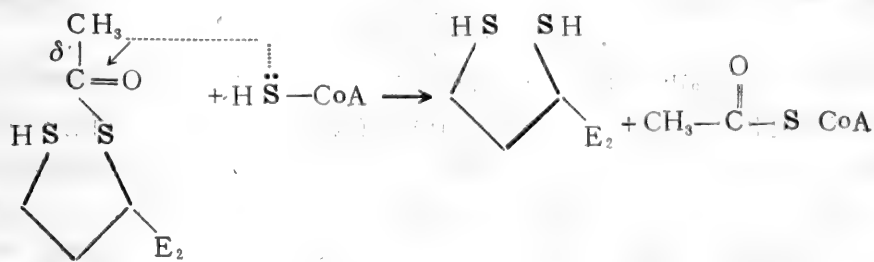


第二步反应是由二氢硫辛酰转乙酰基酶催化, 该酶催化羟乙基脱氢形成乙酰基, 然后将乙酰基转移到硫辛酸的 C-6 位上去。

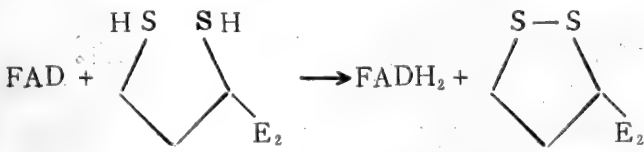


经过这步反应，TPP 负碳离子重新 恢复，可以再参加下一步脱羧反应。

第三步反应亦是由二氢硫辛酰转乙酰基酶催化。在该酶的催化下，乙酰基从硫辛酸上转移到辅酶 A(CoA-SH)上，生成乙酰 CoA 和还原型的二氢硫辛酰。



第四步反应是由二氢硫辛酰脱氢酶催化的。在该酶的作用下，二氢硫辛酰重新被氧化成硫辛酰，氢原子被该酶的辅基 FAD 接受。



最后一步反应是 FADH₂ 被 NAD⁺ 氧化，重新变成 FAD,而 NAD⁺ 则被还原为 NADH

$$\text{FADH}_2 + \text{NAD}^+ \longrightarrow \text{FAD} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

上述丙酮酸脱氢酶复合物中的各步反应是在很大的结构化的组织中进行的，这就为反应准确而有效地进行提供了方便(图9—9)。如果这个酶复合物中的各组分是分散在介质中，仅

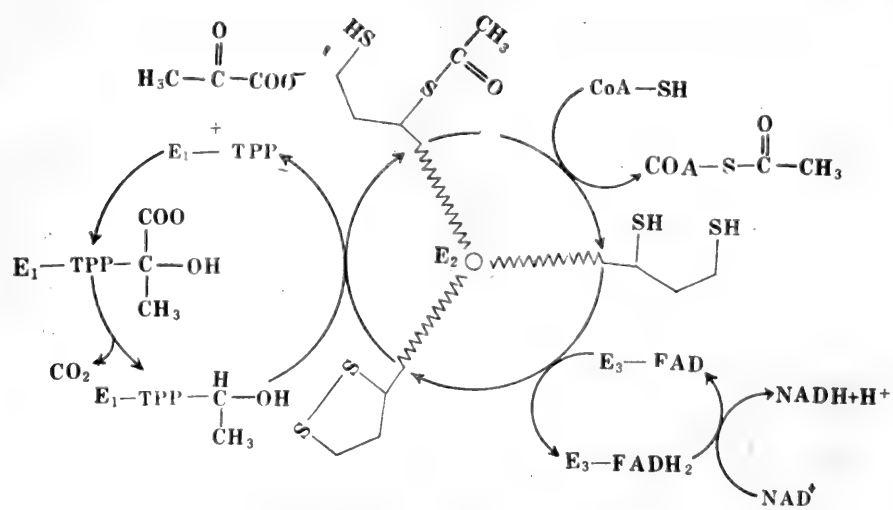


图9—9 丙酮酸脱氢酶复合物催化反应的机制

仅靠它们彼此扩散、随机相遇来完成这几步反应则是困难的。因为该复合物的各种酶本身就是一个很大的聚合体，它们需要较多的时间才能彼此相遇。

由丙酮酸氧化脱羧形成乙酰 CoA 的反应是糖在有氧条件下进入三羧酸循环的关键步骤，它对控制糖的有氧分解有着重要的作用。

丙酮酸脱氢酶复合物的活性可受到两种不同的调节方式控制，即共价修饰调节和别构调节。

还有两种辅助性的酶与丙酮酸脱氢酶复合物结合在一起，它们对丙酮酸脱氢酶复合物活性的共价修饰调节起很重要的作用。一种是丙酮酸脱氢酶激酶，另一种是丙酮酸脱氢酶磷酸酶。当细胞含有较高水平的 ATP、并含有丰富的乙酰 CoA(它也是脂酸降解的产物)时，便构成了一种信号，表示乙酰 CoA 不需要再继续合成。在这种情况下，ATP 作为丙酮酸脱氢酶激酶的激活剂刺激它的活性。激活后的这个激酶能利用 ATP 使丙酮酸脱氢酶特定部位上的丝氨酸残基磷酸化而失去活性。但是，当细胞需要能量(即 ATP 水平降低)时，无活性的磷酸化的丙酮酸脱氢酶便在丙酮酸脱氢酶磷酸酶的催化下，脱去磷酸基而恢复其活性。这个磷酸酶的活性受 Ca^{2+} 浓度调节。当游离的 Ca^{2+} 浓度升高时，这个酶便可激活。而游离 Ca^{2+} 浓度的变化取决于细胞对 ATP 的需要，当细胞需要产生 ATP 时， Ca^{2+} 浓度也就随之升高。因此，游离的 Ca^{2+} 浓度的变化可以作为代谢变化的一种重要的信息。

丙酮酸脱氢酶复合物也受多种效应物的别构调节。ATP、乙酰 CoA 和 NADH 是这个复合物的强烈的抑制剂。乙酰 CoA 抑制二氢硫辛酰转乙酰基酶的活性；NADH 能抑制二氢硫辛酰脱氢酶的活性；ATP 可抑制丙酮酸脱氢酶的活性。这就是说，当细胞含丰富的乙酰 CoA(或脂酸)，而且 ATP 的浓度以及 NADH/NAD⁺ 的比例高时，丙酮酸脱氢酶复合物的活性便会关闭。

二、三羧酸循环

丙酮酸氧化脱羧转变成乙酰 CoA 后，可进一步被氧化成 CO_2 和 H_2O 。这个过程实际上包括两个连续的反应步骤，一个是三羧酸循环，另一个是电子传递与磷酸化反应(氧化磷酸化)。电子传递与磷酸化反应已于第八章作了介绍，这里仅介绍三羧酸循环所包含的反应。

三羧酸循环是由 Hans Krebs 于 1937 年提出来的。现在的三羧酸循环途径虽比当初更完善，但基本上仍是 Krebs 最初所提出的路线。

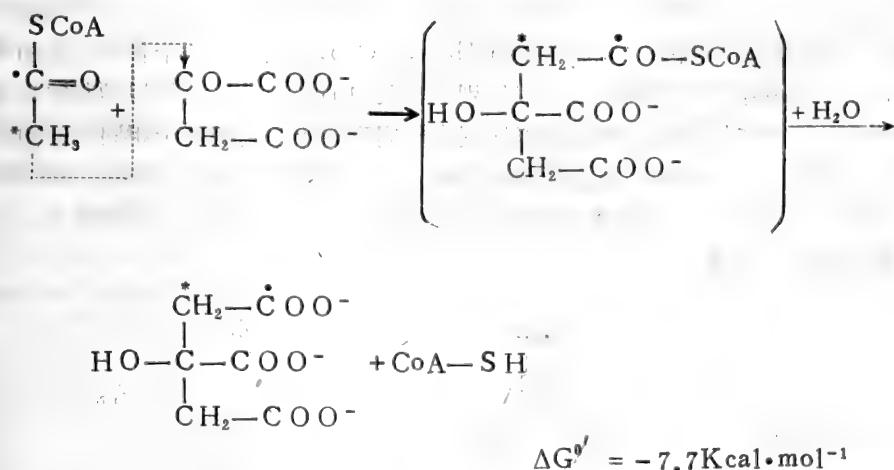
三羧酸循环是以乙酰 CoA 同草酰乙酸缩合成柠檬酸而开始的，中间经多步反应又重新生成草酰乙酸，只有乙酰基上的两个碳原子被完全降解掉。由于最初几年尚不知道乙酰 CoA 与草酰乙酸缩合后所生成的是柠檬酸，还是其他某种三羧酸，例如异柠檬酸，所以只好叫做三羧酸循环(Tricarboxylic acid cycle，简称 TCA 循环)。后来知道是柠檬酸，所以该循环又叫做柠檬酸循环。由于三羧酸循环是由 Krebs 提出来的，故也叫做 Krebs 循环。

1. 三羧酸循环的中间步骤

(1) 柠檬酸的生成

三羧酸循环的第一步反应是乙酰 CoA 在柠檬酸合酶(Citrate Synthase)的催化下，与细胞内原有的草酰乙酸(Oxaloacetate)缩合成柠檬酸(citrate)。这实际上是一种醛醇缩合反应。同位素标记实验证明，乙酰 CoA 上的甲基碳与草酰乙酸的羧基碳结合。柠檬酰 CoA

是柠檬酸合酶催化反应中生成的一种瞬间中间物，紧接着被水解释放出游离的辅酶 A 并产生柠檬酸。辅酶 A 又可参加丙酮酸脱氢酶复合物催化的反应。

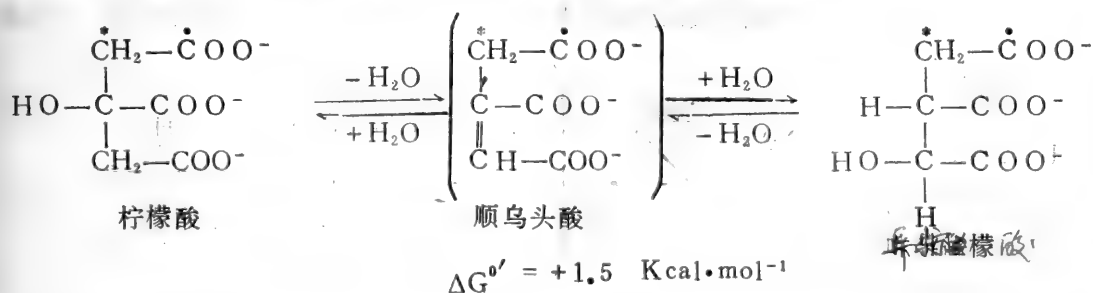


由于乙酰 CoA 是一种高能化合物，当硫酯键被水解时可以释放出大量的能量，因而在细胞内可以推动反应向生成柠檬酸的方向进行。

柠檬酸合酶*催化的反应是不可逆的，是三羧酸循环的限速反应步骤。该酶受到多种效应物的调节（见后述）。

(2) 柠檬酸转变成异柠檬酸

柠檬酸必须转变成异柠檬酸(isocitrate)才能经受氧化脱羧反应。这一异构化反应是由顺乌头酸酶(aconitase)催化的。顺乌头酸酶位于线粒体内膜上，它含有铁-硫中心，可能作为酶的辅基。顺乌头酸(cis-aconitate)是该酶作用的一种中间物，在正常的情况下，它并不从这个酶的活性中心部位上解离下来，而是很快地转变成异柠檬酸。



该步反应是可逆的，在平衡时，异柠檬酸占混合物的10%，但由于异柠檬酸在循环中很快被后续反应移走，故在细胞内可以向右进行。

顺乌头酸酶作用于对称性底物(柠檬酸是一种对称性化合物)时，对其中两个相同的基团具有选择性。如上式反应所示，羟基的移位(即脱水与加水反应)只涉及原初的草酰乙酸上的

* 原称合成酶(Synthetase)，现一般称为合酶(synthase)。

—CH₂—一位，而不涉及乙酰基上的—CH₂—(带放射性标记的)。对这种选择的解释是：根据酶作用的立体专一性，酶分子活性中心是不对称的，有三个不同的结合位，这三个不同的结合位只有在与底物分子的三个不同的取代基完全互补配对时，该酶才能进行催化。柠檬酸的中心碳连接有四个取代基，其中两个是相同的(—CH₂—COO⁻)。但是这两个相同的基团在空间取向上是不同的，也就是说在空间上是可以区别的(图9-10)。因此，当柠檬酸与顺乌头酸酶的活性中心结合时，酶活性中心的微环境能区别在空间取向上不同的两个相同的基团，使得两个相同的基团中只有一个被酶作用，而另一个则不被酶催化(图9-10)。顺乌头酸酶的这种作用特性就解释了为什么后续的脱羧反应只发生在与乙酰基参入部位相对的碳位上，而不发生在乙酰基参入部位这一端。

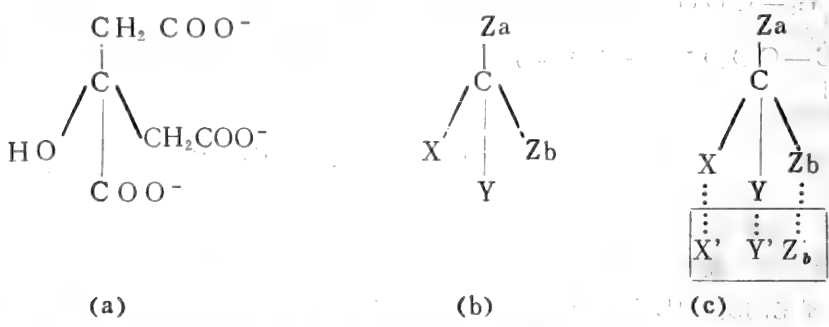
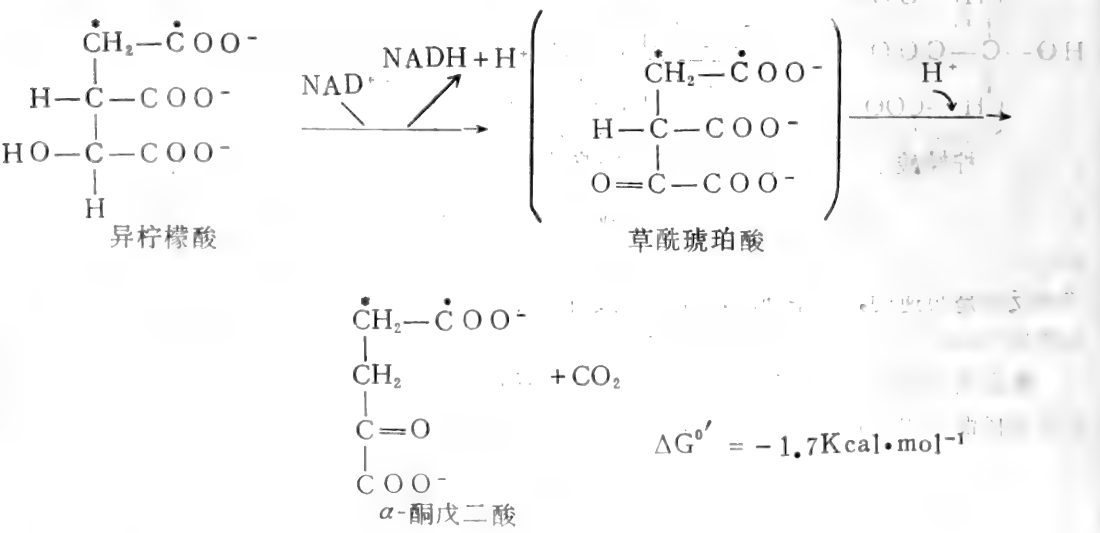


图9-10 顺乌头酸酶作用于柠檬酸时对基团的选择。(a)柠檬酸的结构式；(b)用符号表示的柠檬酸结构，Za和Zb强调相同的基团在空间上的差别；(c)只有当柠檬酸分子上的X、Y和Zb同酶活性中心的三个结合位互补结合时，酶才能起催化作用。而X、Y和Za不能完全互补结合，也不能被酶催化。

(3) 异柠檬酸脱氢酶催化的反应

在异柠檬酸脱氢酶的催化下，异柠檬酸氧化脱羧生成α-酮戊二酸(α-Ketoglutarate)。在这个反应中涉及中间物草酰琥珀酸的形成。草酰琥珀酸(Oxalosuccinate)并不从酶分子上解

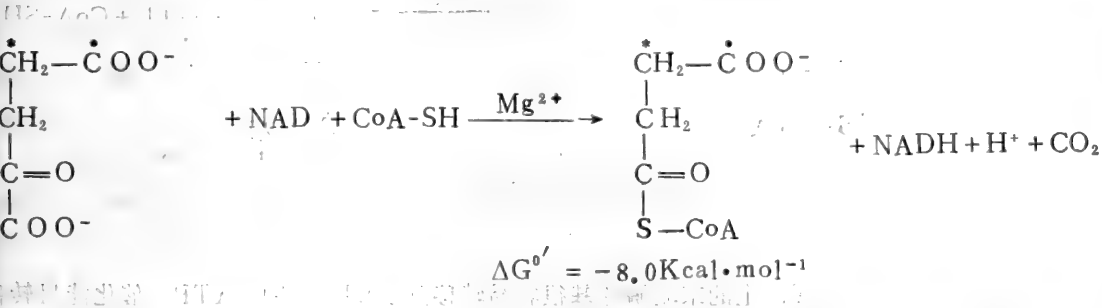


离下来，而是很快地脱羧产生 α -酮戊二酸和 CO_2 ， α -酮戊二酸从酶上释放出来。 α -酮戊二酸形成的速度在决定三羧酸循环的总速度方面是很重要的。

有两种类型的异柠檬酸脱氢酶，一种是以 NAD^+ 作为辅酶，另一种是以 NADP^+ 作为辅酶。这两种酶都能催化上面的反应。在线粒体中，这两种异柠檬酸脱氢酶都存在，但以需 NAD^+ 的酶占优势。在胞液中，只发现以 NADP^+ 作辅酶的异柠檬酸脱氢酶，它在为氨基酸的生物合成提供 α -酮戊二酸(以前体的形式将 α -酮戊二酸转运到胞液中)以及为生物合成反应提供 NADPH 中起重要的作用。

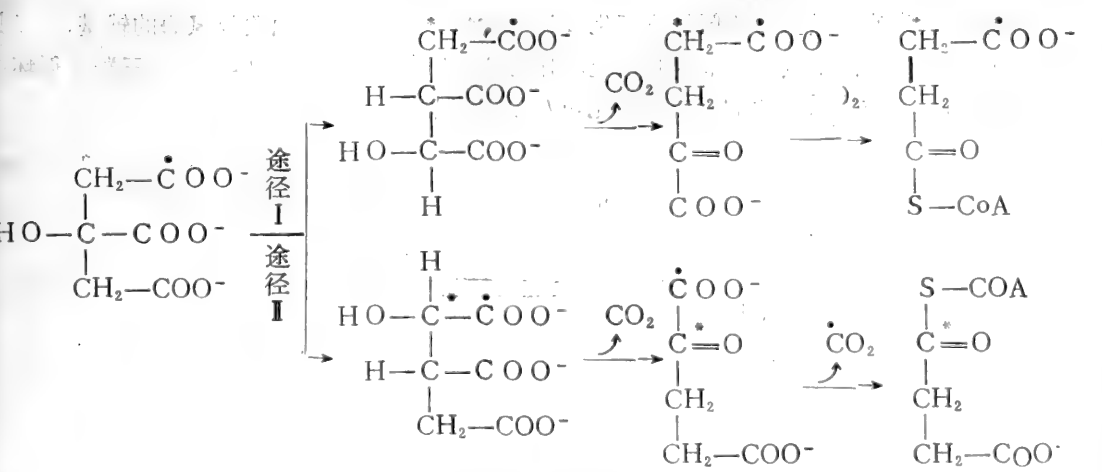
(4) α -酮戊二酸转变成琥珀酰 CoA

α -酮戊二酸在 α -酮戊二酸脱氢酶复合物的催化下，氧化脱羧，产生琥珀酰 CoA (succinyl-CoA) 和 CO_2 。



α -酮戊二酸脱氢酶复合物催化反应的机制与丙酮酸脱氢酶复合物催化的反应非常相似，而且， α -酮戊二酸脱氢酶复合物的组成也与丙酮酸脱氢酶复合物相似，也包括三种不同的酶和五种辅助因子(TPP、FAD、CoA-SH、 NAD^+ 和硫辛酸)。

α -酮戊二酸脱氢酶复合物催化的反应是不可逆的，该步反应也是三羧酸循环的控制点之一。

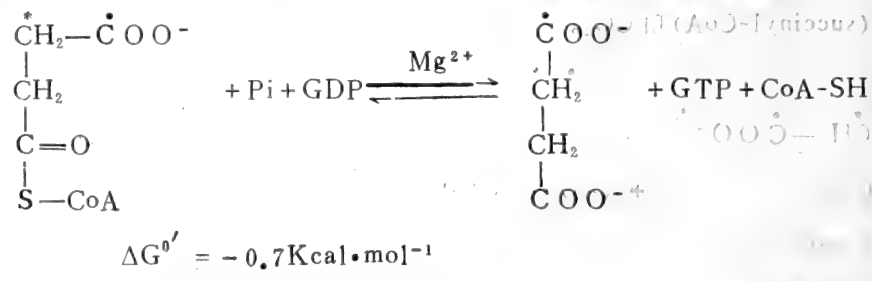


(途径 II 实际并不出现)

如果说，顺乌头酸酶对柠檬酸的两个相同的基团没有选择性，那么， α -酮戊二酸脱羧反应所释放出的 CO_2 应有一半含有放射性标记。但是，实际上 α -酮戊二酸脱羧释放的 CO_2 不含放射性标记。从而证实了顺乌头酸酶具有选择性（见393页反应式！）。

(5) 琥珀酸的生成

琥珀酰 CoA 是一种高能化合物，水解时硫酯键断开，可释放出很高的自由能。在细胞内，琥珀酰 CoA 的硫酯键的断开与 GDP 的磷酸化偶联进行。催化这个偶联反应的酶是琥珀酰 CoA 合成酶，反应的产物是琥珀酸(succinate)、GTP 和辅酶 A。



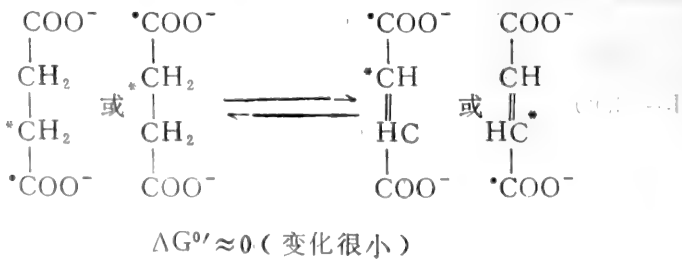
这步反应是可逆的。GTP 上的末端磷酸基很容易转移到 ADP 上生成 ATP。催化能量转移反应的酶是核苷二磷酸激酶(nucleoside diphosphokinase)。



琥珀酰 CoA 合成酶催化的上述反应是三羧酸循环中唯一直接产生高能磷酸化合物的反应，是底物水平磷酸化的又一例子。

(6) 琥珀酸转变成延胡索酸

琥珀酸在琥珀酸脱氢酶的催化下氧化成延胡索酸。FAD 是琥珀酸脱氢酶的辅基，以共价键连接在该酶蛋白组氨酸残基的侧链上，作为这一氧化反应的氢受体。这是三羧酸循环中唯一不以 NAD 作为氢受体的反应（参见第八章第四节）。

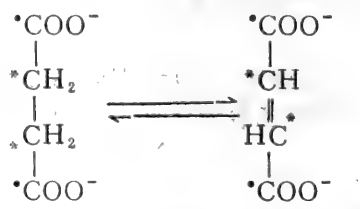


琥珀酸脱氢酶是一种完全的膜结合蛋白，与铁-硫蛋白一起构成了琥珀酸-CoQ 还原酶，也就是呼吸链复合物 I。琥珀酸氧化脱下的氢 ($2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$) 经琥珀酸脱氢酶的辅基 FAD 传递到铁-硫中心，再传递到 CoQ，电子从 CoQ 进入呼吸链，最终被传递到氧（见第八章第四节）。

丙二酸 ($^-\text{OOC}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$) 是琥珀酸的结构类似物，是琥珀酸脱氢酶的一种重要的竞争性抑制剂，对三羧酸循环途径的确定起了很重要的作用。Krebs 发现，当用肌肉悬浮液研究丙酮酸的有氧分解时，在丙酮酸氧化所必需的活性有机物存在的条件下加入丙二酸，丙酮酸的有氧分解被抑制。这说明，琥珀酸和琥珀酸脱氢酶是丙酮酸有氧分解所必需的组分，并且他进一步发现，柠檬酸、 α -酮戊二酸以及琥珀酸在肌肉悬浮液中积累。这表明，当没有丙二酸存在时，柠檬酸和 α -酮戊二酸可正常地转变成琥珀酸。Krebs 根据这些实验以及其他一些实验的结果，就提出了肌肉中糖有氧分解的三羧酸循环路线。

琥珀酸脱氢酶具有很强的立体专一性，它只能催化琥珀酸从相反位置脱氢转变成延胡索酸（反丁烯二酸）及其逆反应，而不能催化琥珀酸从同一侧脱氢产生顺丁烯二酸及其逆反应。

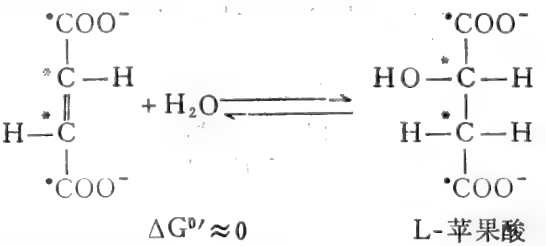
由于琥珀酸是一种对称性化合物，而琥珀酸脱氢酶没有区分琥珀酸分子两端的能力（这与顺乌头酸酶的作用特性不同）。如果把上面琥珀酸脱氢酶催化的反应化简（合并起来考虑），就可以写成：



所以，来自原初乙酰基 ($\text{CH}_3-\text{CO}-$) 上的放射性标记在琥珀酸、延胡索酸以及后面的苹果酸和草酰乙酸上的所有四个碳原子实际上都含有，只是在每个碳原子上出现放射标记的可能性只有 50%。

(7) 苹果酸的生成

延胡索酸在延胡索酸酶 (fumarase) 的催化下，水合变成 L-苹果酸 (L-malate)。所以延胡索酸酶也叫做延胡索酸水合酶 (hydratase)。

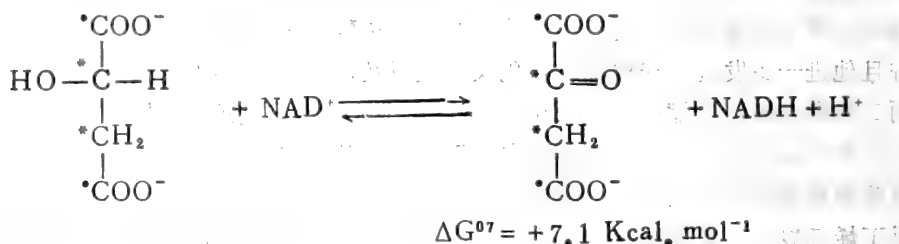


该反应是可逆的。延胡索酸酶具有很高的立体专一性。它只作用于延胡索酸，从双键的相反

方向加 H 和 OH, 生成 L-苹果酸; 或者催化逆反应, L-苹果酸脱水变成延胡索酸。该酶不能催化顺丁烯二酸 (延胡索酸的异构体) 加水转变成苹果酸, 也不能催化 D-苹果酸的脱水反应。

(8) 草酰乙酸的重新生成

三羧酸循环的最后一步反应是由 L-苹果酸脱氢酶催化的。在 L-苹果酸脱氢酶 (其辅酶是 NAD^+) 的催化下, L-苹果酸在羟基碳位上脱氢氧化转变成草酰乙酸。

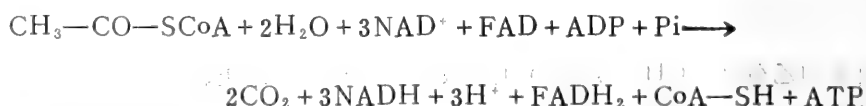


该反应在热力学上不利于草酰乙酸的生成, 而有利于逆向反应。但是, 在完整细胞内, 不利于草酰乙酸生成的反应可以被三羧酸循环的第一步反应 (由柠檬酸合酶催化) 所推动, 向有利于草酰乙酸生成的方向进行 (见第八章第二节)。草酰乙酸一旦生成, 很快就被其后的缩合反应所移走。所以, 草酰乙酸在细胞内的浓度是很低的 (低于 10^{-8} mol/L)。

2. 三羧酸循环小结

上述三羧酸循环的整个化学反应过程如图9—11所示。从整个循环过程我们可以看出:

(1) 当一分子的乙酰 CoA 与草酰乙酸缩合而进入三羧酸循环后, 其整个化学反应的净结果是:



这表明, 三羧酸循环每循环一次, 只有一分子的乙酰 CoA 被氧化, 所有三羧酸循环的中间物并不因参加反应而有所增减。

(2) 乙酰 CoA 进入三羧酸循环之后, 有两处脱羧反应; 有四处脱氢反应, 共生成三分子的 NADH 和一分子的 FADH_2 ; 一次底物水平磷酸化, 生成一分子的 ATP 。脱氢反应生成的 NADH 和 FADH_2 进入电子传递链, 发生氧化磷酸化作用, 生成 ATP 。所以三羧酸循环与氧化磷酸化是协同进行的。

(3) 同位素标记实验表明, 乙酰 CoA 的乙酰基的碳并没有在三羧酸循环的第一轮中除去。经脱羧反应生成的两分子 CO_2 来自原有的草酰乙酸, 而乙酰基上的两个碳参与了草酰乙酸的重新生成 (注意, 这与第(1)点并不矛盾, 只要我们从整个反应的化学计量量去认识, 是很容易理解的)。被标记的乙酰基上的羰基碳可以在该循环的第二轮反应的第(3)步和第(4)步分别脱去。被标记的乙酰基上的甲基碳在两轮循环之后仍被保留。在第一轮中, 随机地保留在琥珀酸的中间两个碳上; 在第二轮中, 随机地保留在琥珀酸的所有四个碳原子

上。这就意味着在第三轮循环中的两次脱羧反应将消去50%的来自最初甲基碳的放射性标记。此后，每轮循环将消去残留标记的50%。

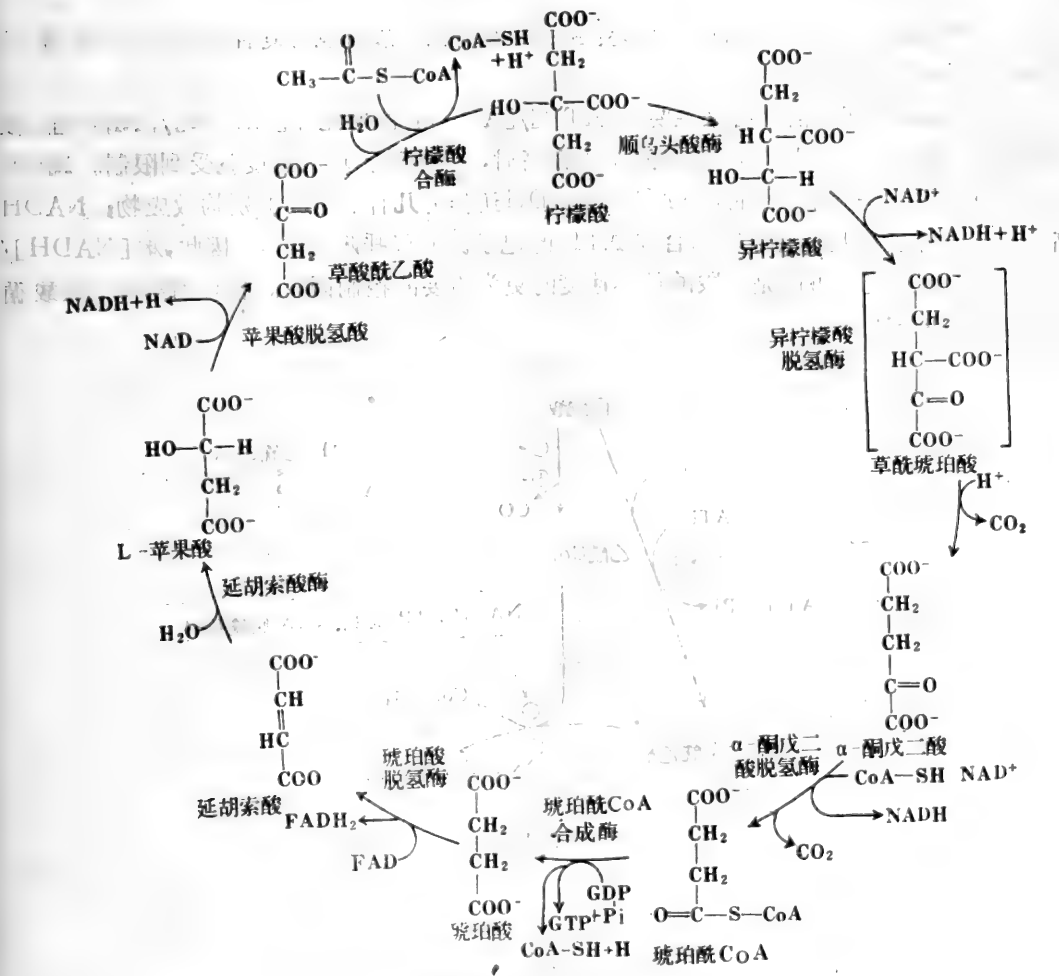


图9—11 三羧酸循环

三、三羧酸循环的控制

三羧酸循环的活性与细胞的需要密切相关。主要取决于两方面的需要：一是细胞对能量的需要；另一个是细胞内的合成反应对三羧酸循环中间物的需要。

如同大多数代谢途径一样，三羧酸循环的第一步反应，即柠檬酸合成反应，被认为是该循环的限速反应。柠檬酸合酶的活性受到多种因素的控制，首先受到该酶的底物乙酰CoA和草酰乙酸的浓度控制，特别是草酰乙酸的浓度。草酰乙酸在线粒体内的浓度是比较低的，并且其浓度取决于生理条件。因此，草酰乙酸可能是最重要的控制因素。琥珀酰CoA也是柠檬酸合酶的控制因素。当琥珀酰CoA超过正常的稳态水平时，它就通过降低柠檬酸合酶对乙酰CoA的亲和力而对该酶进行抑制。当细胞内的脂酸水平和 NADH 的水平升高时，亦可对柠檬酸合酶的活性造成别构抑制。此外，当 ATP 的水平很高时也可抑制柠檬酸合酶的活性。

三羧循环酸的第二个控制点是异柠檬酸脱氢酶催化的反应。ADP 和 NAD⁺ 是该酶的别构激活剂，能提高该酶对底物的亲和力。ATP 和 NADH 则是异柠檬酸脱氢酶的别构抑制剂。

第三个控制点是 α -酮戊二酸脱氢酶复合物。 α -酮戊二酸脱氢酶复合物受它的产物琥珀 CoA 和 NADH 控制。

总之，三羧酸循环的活性看来主要受[ATP]/[ADP]的浓度比和[NADH]/[NAD⁺]的浓度比控制。细胞内的 ATP 和 NADH 的水平很高时，三羧酸循环的速度就受到限制。NAD⁺ 不仅作为几种脱氢酶的辅酶，而且 NAD⁺ 和 NADH 还作为几种脱氢酶的别构效应物，NADH 的高水平还意味着细胞含有丰富的合成 ATP 的电子源（经呼吸链）。因此，[NADH]/[NAD⁺]浓度比例变化可能是三羧酸循环速度的更为重要的控制因素。各种因素对三羧酸循环的影响于图9—12所示。

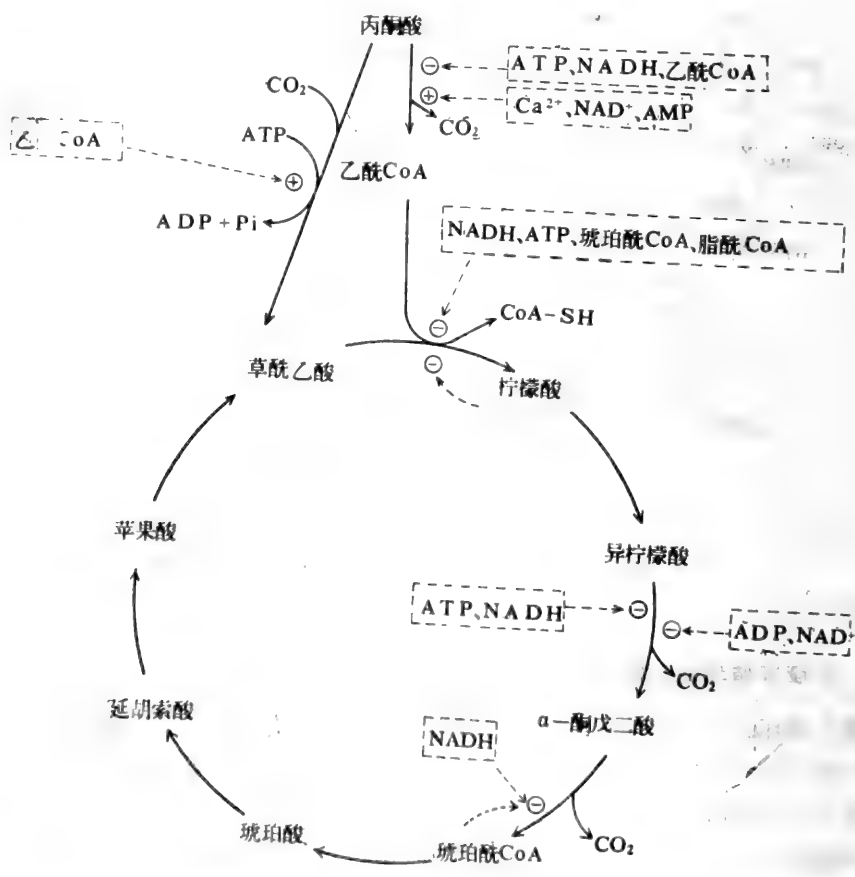


图9—12 三羧酸循环的调节
⊖表示抑制作用；⊕表示激活作用。

四、三羧酸循环的生物学意义

1. 提供能量

在有氧的条件下，一分子的葡萄糖经过上述三个阶段的反应，并经氧化磷酸化，总共可产生38分子的ATP，其中以三羧酸循环产生的ATP最多。各阶段产生ATP的情况如表9—1所示。

一克分子的葡萄糖完全氧化可产生 686,000 卡的能量。若每摩尔的ADP磷酸化需要 7,300 卡的能量的话，那么一摩尔的葡萄糖所产生的38摩尔的ATP共利用能量 $7,300 \times 38 = 277,400$ 卡，能量的利用率达 40%。其余的能量以热的形式散失，并有维持体温的作用，但不能用来推动生物合成反应。生物合成反应只能利用ATP。一分子葡萄糖完成氧化产生ATP的总反应是：

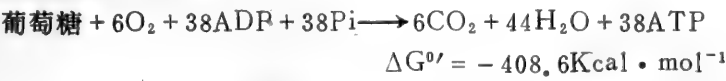


表9—1 一分子葡萄糖完全氧化产生ATP的情况

反 应 顺 序	每分子葡萄糖产生ATP的数目
第一阶段：酵解（发生在胞液中）	
葡萄糖的磷酸化	- 1
Fru-6-P 的磷酸化	- 1
1, 3-DPG→3-磷酸甘油酸	+ 1×2
PEP→丙酮酸	+ 1×2
3-磷酸甘油醛脱氢产生的 NADH 进入线粒体后经呼吸链产生	+ 3×2
第二阶段：丙酮酸氧化脱羧反应 （发生在线粒体中）	
丙酮酸→乙酰 CoA，反应中产生的NADH 经呼吸链产生	+ 3×2
第三阶段：三羧酸循环	
异柠檬酸、α-酮戊二酸、苹果酸氧化分别产生 1 分子 NADH，经呼吸链产生	+ 3×3×2
琥珀酸氧化产生 1 分子的 FADH ₂ ，经呼吸链产生	+ 2×2
在琥珀酰-CoA 水平上进行底物水平磷酸化	+ 1×2
净产生	+ 38

在真核生物中，酵解反应发生在胞液中，而完整的线粒体对 NADH 和 NAD 是不可渗透的，那么 NADH 怎样才能被呼吸链氧化呢？NADH 是在3-磷酸甘油醛被氧化时产生的，而 NADH 必须被氧化重新产生 NAD，酵解才能继续进行。有两种解决的途径。一种是苹果酸-天冬氨酸穿梭系统（malate-aspartate shuttle system），另一种是磷酸甘油-磷酸二羟丙酮穿梭系统（glycerol phosphate-dihydroxyacetone phosphate shuttle system）。

（1）苹果酸-天冬氨酸穿梭

苹果酸-天冬氨酸穿梭系统存在于动物的肝脏、心脏和肾中，其穿梭反应的机制如图9—13所示。

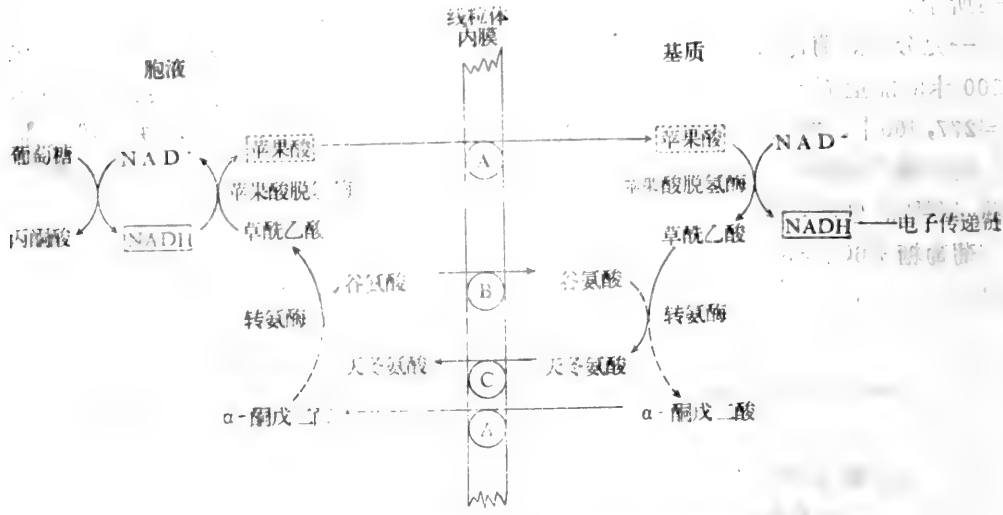


图9—13 苹果酸-天冬氨酸穿梭机制

在胞液中的苹果酸脱氢酶的催化下，酵解产生的 NADH 被草酰乙酸氧化，生成苹果酸并重新产生 NAD⁺。苹果酸被内膜上的专一性载体 (A) 跨膜运送进入到线粒体基质中。苹果酸在基质中苹果脱氢酶的催化下氧化，脱下的氢和电子被基质中的 NAD 接受，产生 NADH 和草酰乙酸，NADH 即可进入呼吸链，被氧化产生三分子的 ATP。草酰乙酸在转氨酶的催化下转变成天冬氨酸。天冬氨酸可通过内膜上的专一性载体 (C) 转运到胞液中。胞液中的转氨酶又可催化天冬氨酸转氨反应，重新生成草酰乙酸。草酰乙酸又可作为胞液中 NADH 的氧化剂，重复上述穿梭反应。所以，在苹果酸-天冬氨酸穿梭系统的协助下，一分子的葡萄糖完全氧化可产生38分子的 ATP。

(2) 磷酸甘油-磷酸二羟丙酮穿梭

在骨骼肌和大脑中存在另外一种不同的穿梭系统，即磷酸甘油-磷酸二羟丙酮穿梭系统。在该系统中，3-磷酸甘油和磷酸二羟丙酮通过扩散容易透过线粒体外膜。有两种3-磷酸甘油脱氢酶，一种存在于胞液中，以 NAD 作为辅酶。在胞液中3-磷酸甘油脱氢酶的催化下，胞液中的磷酸二羟丙酮还原为3-磷酸甘油并产生 NADH。3-磷酸甘油通过扩散进入到线粒体内膜外侧。位于线粒体内膜上的3-磷酸甘油脱氢酶是一种膜结合的黄素蛋白(以 FAD 为辅基)。在这个黄素蛋白的催化下，3-磷酸甘油氧化脱氢 ($2H + 2e^-$)，脱下的氢被其辅基 FAD 接受，生成 FADH₂。FADH₂ 在辅酶 Q (CoQ) 部位进入呼吸链，经氧化磷酸化作用只生成两分子的 ATP，比苹果酸-天冬氨酸穿梭反应少生成一分子的 ATP。因为苹果酸-天冬氨酸穿梭反应产生的是 NADH，而不是 FADH₂。所以在磷酸甘油-磷酸二羟丙酮穿梭系统的协助下，一分子的葡萄糖完全氧化只产生36分子的 ATP。在黄素蛋白催化下的另一产物磷酸二羟丙酮通过扩散，又返回到胞液中，重复上述反应。磷酸甘油-磷酸二羟丙酮穿梭反应如图9—14所示。

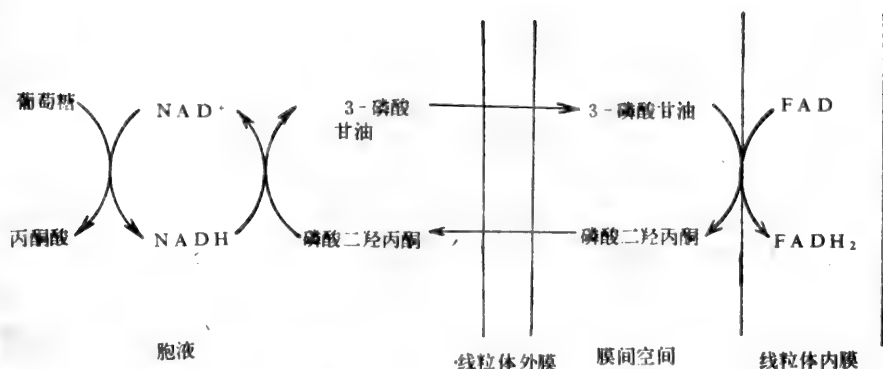


图9—14 磷酸甘油-磷酸二羟丙酮穿梭机制。

2. 三羧酸循环也是其他有机物彻底氧化的一条主要途径

三羧酸循环不仅是糖完全氧化的主要途径，也是其他化合物脂酸、氨基酸等完全氧化的途径。脂酸经 β -氧化产生的乙酰 CoA，可进入三羧酸循环被彻底氧化，同时产生能量。甘油也可经酵解途径转变成丙酮酸，再氧化成乙酰 CoA 进入三羧酸循环。蛋白质水解后产生的氨基酸经过一定的转变，成为糖有氧分解的中间物，然后经三羧酸循环被完全氧化，同时也产生能量。

前已叙及，三羧酸循环的化学计算量表明，乙酰 CoA 的乙酰基单位是能被该循环完全降解的唯一物质。该循环中间物的基本价值在于保证产生重复。如果认为只要把某些氨基酸转变成该循环的中间物就可导致它们本身完全氧化，那就错了。例如谷氨酸、谷酰胺等氨基酸转变 α -酮戊二酸后，并不导致 α -酮戊二酸的自身净氧化，只会导致该循环中间物的浓度升高。但是，氨基酸在生物体内是能被彻底氧化的，问题在于如何达到这个目的。

在骨骼肌中，磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (PEP-CK)、丙酮酸激酶 (PK) 和丙酮酸脱氢酶复合物 (PDH) 可以催化草酰乙酸到乙酰 CoA 的转变，这就允许三羧酸循环中的过量中间物 (包括由氨基酸转变而来的产物) 被完全氧化。例如谷氨酸等氨基酸转变成 α -酮戊二酸后，可通过这个途径转变成乙酰 CoA 而被彻底氧化，如图9—15所示。总的化学计算量是： α -酮戊二酸 $\rightarrow 5\text{CO}_2$ 。此途径包括五步脱羧反应，在三羧酸循环中三次，在该循环外两次。注意，草酰乙酸取道磷酸烯醇丙酮酸并不意味着一定会被氧化，因为丙酮酸可转变成丙氨酸，或者沿糖异生途径转变成糖 (见后续有关内容)。

3. 为其他物质的合成提供碳骨架

葡萄糖降解产生的丙酮酸，以及三羧酸循环的中间物 α -酮戊二酸和草酰乙酸是合成丙氨酸、谷氨酸和天冬氨酸的基本碳骨架，这些氨基酸还可经相应的转变合成其他氨基酸 (见第十一章)。乙酰 CoA 可以用来合成脂酸。脱羧反应产生的 CO_2 为体内某些物质的合成提供一碳单位。

总之，三羧酸循环处在物质代谢的中心位置上，是三大物质 (糖、脂、蛋白质) 相互转变的枢纽。

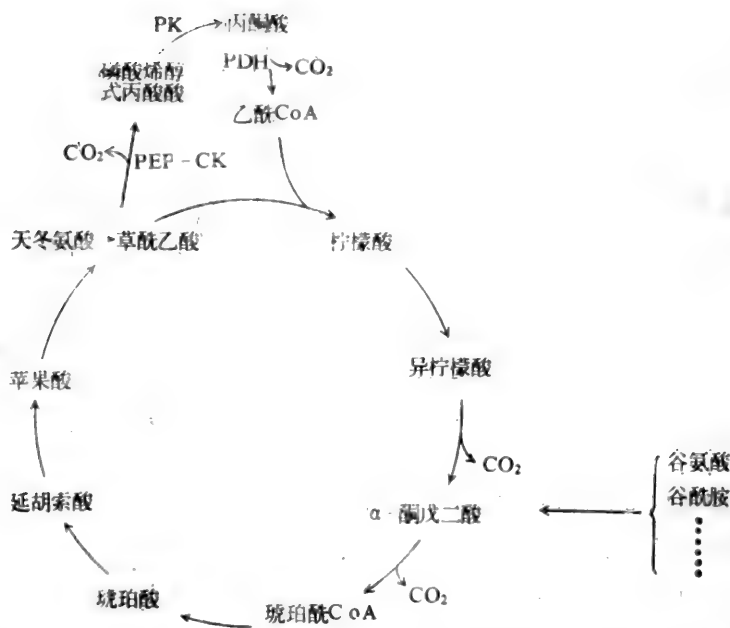


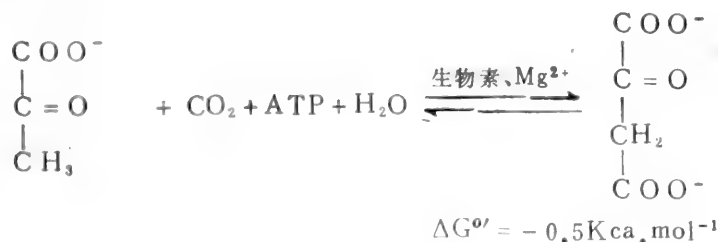
图 9—15 谷氨酸等氨基酸转变成 TCA 循环的中间物后完全氧化的途径

五、三羧酸循环中间物的回补

当三羧酸循环的中间物因用于其他物质的合成时（尤其是当蛋白质合成旺盛时），其中间物的浓度会减少，从而导致该循环的终端产物草酰乙酸不能重复生成而影响它的正常运行。于是就会减少（或中断）能量的产生和中间物继续供应，使合成代谢受阻。在这种情况下，为确保三羧酸循环的畅通，必须要有相应补足该循环中间物的途径，即所谓回补途径（anaplerosis）。

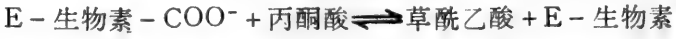
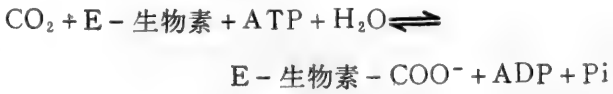
1. 丙酮酸羧化成草酰乙酸

在动物体内，最重要的回补途径是丙酮酸羧化变成草酰乙酸。这一反应是丙酮酸羧化酶（carboxylase）催化的，它是一种线粒体酶。该反应需要 ATP 提供能量，并需要生物素以及 Mg^{2+} 。



丙酮酸羧化酶是一种很复杂的酶，它是由四个亚基构成的寡聚体蛋白，分子量大约为 650,000，

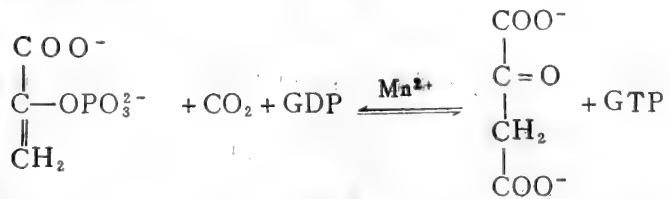
每个亚基共价地结合有一个辅基生物素。这个酶催化的反应是分步进行的。首先是 CO_2 被活化并结合到生物素上。然后将活化的 $-\text{COO}^-$ 转移到与酶活性中心结合的丙酮酸上，从而羧化成草酰乙酸。



乙酰 CoA 是丙酮酸羧化酶最重要的别构激活剂。在乙酰 CoA 缺气的情况下，丙酮酸羧化酶几乎完全没有活性。当乙酰 CoA 可采用时，丙酮酸羧化酶就被激活，从而使丙酮酸羧化成草酰乙酸，使其浓度升高，于是允许三羧酸循环有效地进行。丙酮酸羧化酶在糖的异生作用中也是一种很重要的酶。

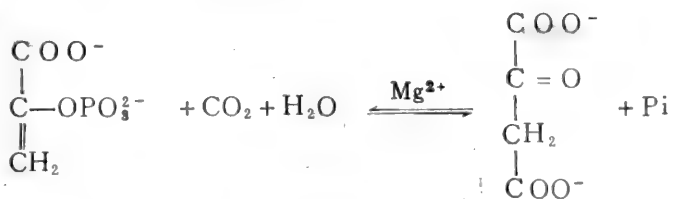
2. 磷酸烯醇式丙酮酸转变成草酰乙酸

在动物的心脏和肌肉组织中，存在一种磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (carboxykinase)，它能催化磷酸烯醇式丙酮酸转变成草酰乙酸，并产生 GTP。

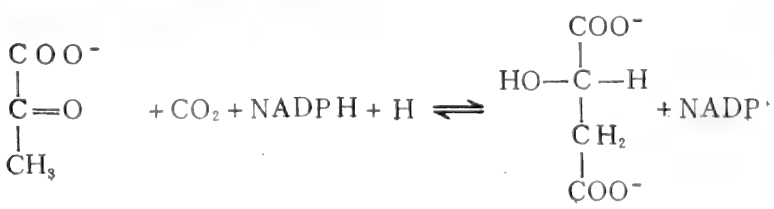


但此酶对草酰乙酸的亲和力大，而对 CO_2 的亲和力很小，故此酶更适合于催化磷酸烯醇式丙酮酸的生成，在糖异生作用中是一种很重要的酶。

在植物和细菌中，有一种磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶，这个酶在动物体中不存在。该酶能催化磷酸烯醇式丙酮酸羧化成草酰乙酸。这个酶不需要生物素，也不需要 ATP。在绿色植物中，磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶不仅为三羧酸循环补充草酰乙酸，而且也是四碳双羧酸植物固定 CO_2 的一步重要反应 (见第五节)。



3. 苹果酸酶催化丙酮酸羧化为苹果酸

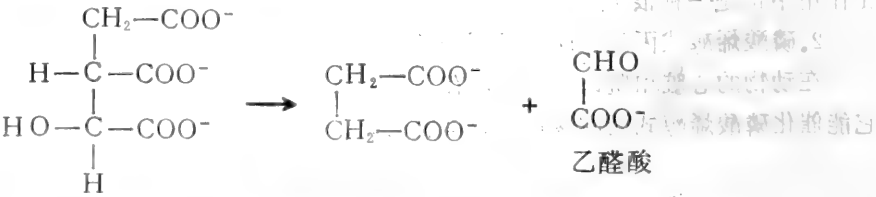


具有回补功能的另一种反应由苹果酸酶 (malic enzyme) 催化, 它能催化 丙酮酸羧化及还原反应, 生成苹果酸, 故有时此酶也叫做苹果酸脱氢酶。该反应发生在胞液中。生成的苹果酸可以通过专一性载体进入到线粒体。在线粒体内的需 NAD^+ 的苹果酸脱氢酶催化下生成草酰乙酸。

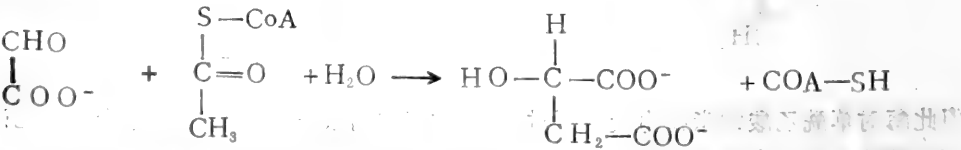
苹果酸酶的辅酶是 NADP^+ , 所以 上述反应的 逆反应可以产生 NADPH 。 NADPH 是许多生物合成反应 (例如脂酸合成) 的还原剂。

4. 乙醛酸循环

在某些植物和微生物细胞中, 除含有三羧酸循环的酶外, 还有另外两种酶, 即异柠檬酸裂合酶和苹果酸合酶。异柠檬酸裂合酶 (isocitrate lyase) 催化异柠檬酸分解产生琥珀酸和乙醛酸。



苹果酸合酶 (malate synthase) 催化乙醛酸和乙酰 CoA 缩合成苹果酸。



乙醛酸循环与三羧酸循环的比较如图 9—16 所示。

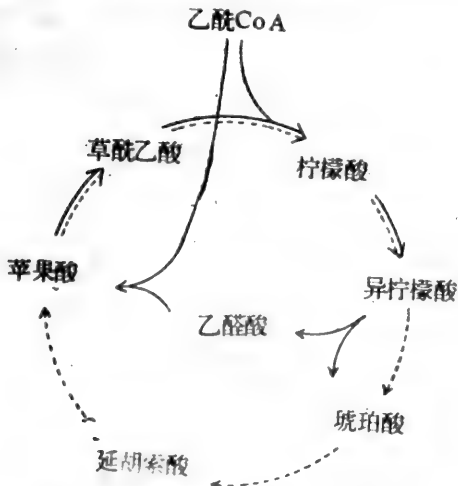
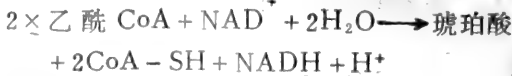


图 9—16 乙醛酸循环与三羧酸循环的比较。实线代表乙醛酸循环, 虚线代表三羧酸循环。

从图9—16 可以看出, 乙醛酸循环有三个反应步骤与三羧酸循环相同, 特殊的酶是异柠檬酸裂合酶和苹果酸合酶。一分 子的乙酰 CoA 与一分 子的草酰乙酸缩合后进入乙醛酸循环生成了一分子的乙醛酸和一分子的琥珀酸。乙醛酸与另一分子的乙酰 CoA 缩合成苹果酸。苹果酸 又可转变成草酰乙酸, 从而完成一次循环。所以, 乙醛酸循环的净结果是两分子的乙酰 CoA 转变成了一分子的琥珀酸。



这样, 通过一次乙醛酸循环, 便有一分子的琥珀酸节余下来。琥珀酸进入三羧酸循环, 可以解决因合成细胞物质而使三羧酸循环中间物减少的问题。

乙醛酸循环的另一个显著的生物学意义是,在某些植物的组织中(例如含油量丰富的植物种子),开辟了一条由脂酸转变成糖以及合成细胞物质的途径。如果没有乙醛酸循环,脂酸经 β -氧化(见第十章)产生的乙酰 CoA 进入三羧酸循环后就会被完全氧化,要想合成糖则是不可能的。但有了乙醛酸循环,就可以升高三羧酸循环中间物的浓度,为合成糖和其他物质提供前体物(例如草酰乙酸沿糖异生途径合成糖,草酰乙酸和 α -酮戊二酸经转氨作用生成氨基酸)。油料作物的种子在发芽时,乙醛酸循环是很活跃的。在油料作物的籽苗以及其他具有乙醛酸循环能力的植物中,乙醛酸循环的酶以及有关代谢途径的酶(例如 β -氧化的有关的酶)共同被分隔在一个特定的细胞器——乙醛酸循环体(glyoxysome)。但是在籽苗生长期之后,乙醛酸循环活性和 β -氧化便不复存在。

在动物体内,因不存在乙醛酸循环,是不能将脂酸转变成糖的。

第三节 磷酸己糖支路

葡萄糖在生物体内的氧化分解主要是通过酵解和三羧酸循环进行的,这也是生物产生能量的主要途径,但绝非是唯一的氧化途径。当加入碘乙酸或氟化物后,酵解和三羧酸循环被抑制,但葡萄糖的消耗并无多大影响。表明在生物体内还有其他可供选择的途径使葡萄糖被氧化利用。

五十年代,发现葡萄糖-6-磷酸可以转变成 CO_2 和5-磷酸核酮糖(一种戊糖),因此就把这个转变途径叫做磷酸戊糖途径。由于葡萄糖-6-磷酸是从酵解途径来的,所以也叫做磷酸己糖支路(hexose monophosphate shunt,简称HMS)。磷酸己糖支路在动物、微生物,特别是植物体内普遍进行。该途径是发生在胞液中的一种需氧过程。

一、磷酸己糖支路的基本过程

葡萄糖-6-磷酸经磷酸己糖支路被氧化分解的过程可分为两个阶段。第一个阶段是葡萄糖-6-磷酸经脱氢脱羧反应生成五碳糖的过程。第二阶段是五碳糖重新合成六碳糖的过程。

磷酸己糖支路的全过程如图9—17所示。

1. 葡萄糖-6-磷酸的氧化和 NADPH 及戊糖的生成

葡萄糖-6-磷酸在葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的催化下,以 NADP^+ 作为受氢体,生成NADPH和磷酸葡萄糖酸内酯(Phosphogluconolactone)(见图9—17步骤①)。磷酸葡萄糖酸内酯是不稳定的,可以自发地转变成6-磷酸葡萄糖酸,但内酯酶能加快这一反应(步骤②)。6-磷酸葡萄糖酸在6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(Phosphogluconate dehydrogenase)催化下,以 NADP^+ 作为受氢体,脱氢脱羧产生5-磷酸核酮糖(ribulose-5-phosphate)以及NADPH和 CO_2 (步骤③)。上述三步反应是该途径第一阶段的反应。

2. 戊糖磷酸酯的相互转变

第三步反应生成的5-磷酸核酮糖可以转变成5-磷酸核糖(步骤④)或5-磷酸木酮糖(步骤⑤)。前者是在磷酸戊糖异构酶(Phosphopentose isomerase)催化下进行的,后者是磷酸戊糖表异构酶(epimerase)催化的产物。这两个酶催化的反应都是可逆的。5-磷酸核

糖 (ribose-5-phosphate)、5-磷酸核酮糖以及5-磷酸木酮糖 (xylulose-5-phosphate) 以一种平衡混合物存在。

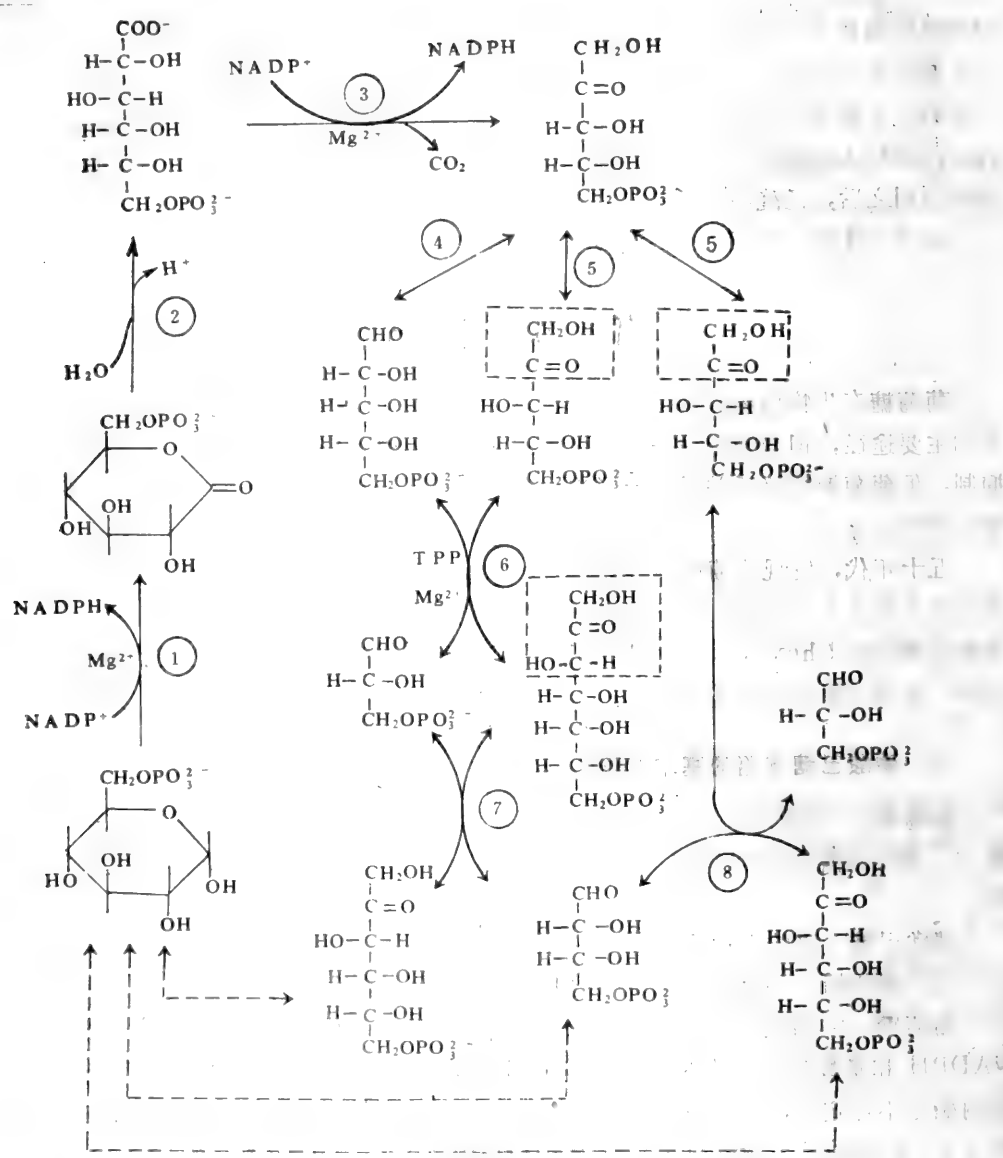


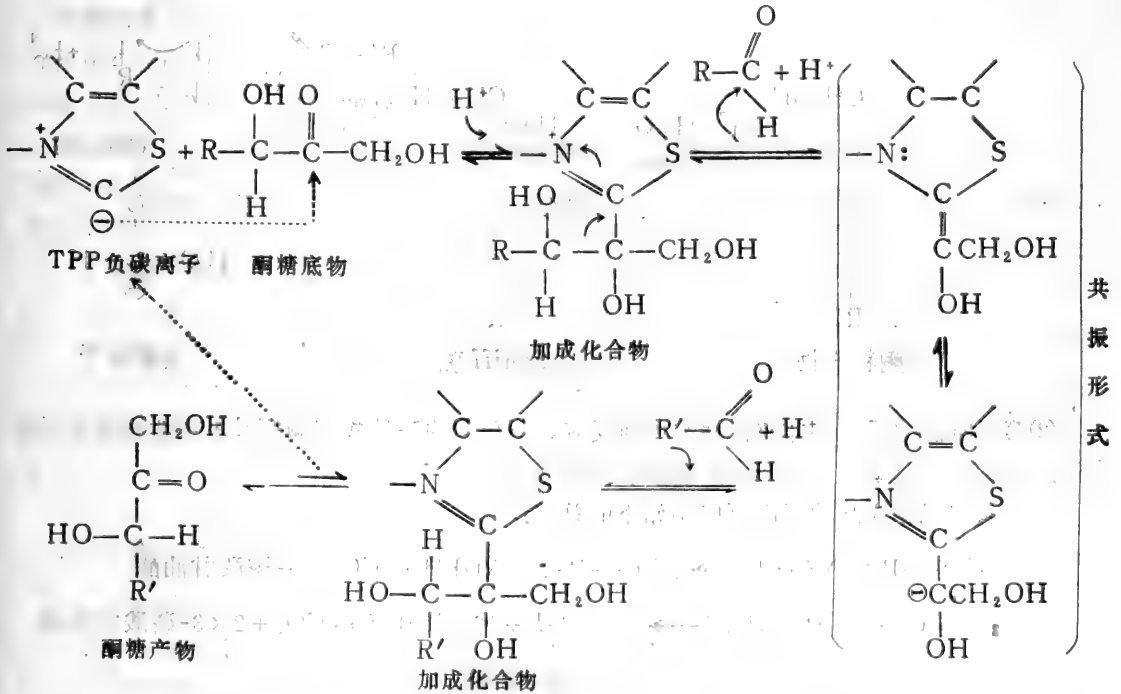
图 9—17 磷酸己糖支路代谢途径

- ①葡萄糖-6-磷酸脱氢酶，②内酯酶，③6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶，④异构酶（同分异构酶），
⑤表异构酶（差向异构酶），⑥⑧转酮醇酶（转羟乙醛酶），⑦转醛醇酶（转二羟丙酮基酶）。
①、②…也代表反应步骤。

3. 糖磷酸酯进一步相互转化

5-磷酸核糖和5-磷酸木酮糖作为起点可以进一步相互转化，产生三碳糖、四碳糖、五碳糖、六碳糖以及七碳糖的磷酸酯。所有这些糖磷酸酯的相互转化都是由转酮醇酶 (transketolase) 和转醛醇酶 (transaldolase) 催化的。

首先，在转酮醇酶的催化下，把5-磷酸木酮糖上的羟乙醛基转移到5-磷酸核糖上，结果生成3-磷酸甘油醛和7-磷酸景天庚酮糖 (步骤⑥)。转酮醇酶需要焦磷酸硫胺素 (TPP) 作为辅酶，其反应机制如下所示：

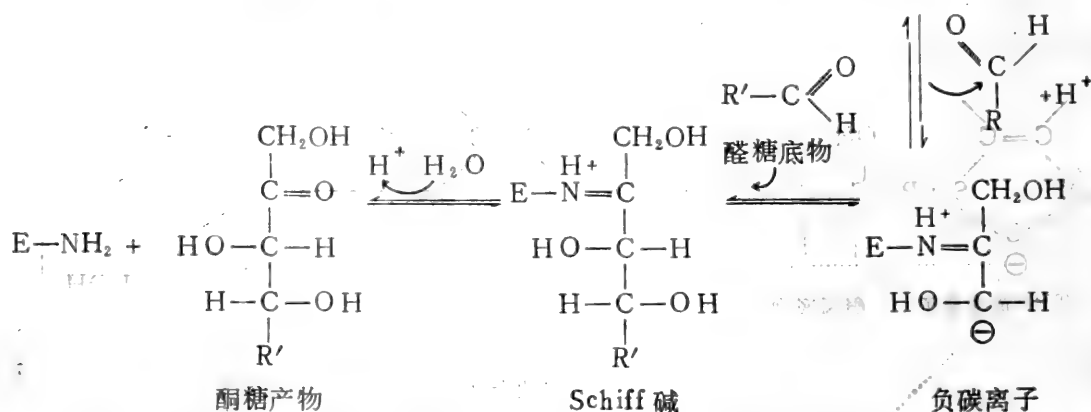
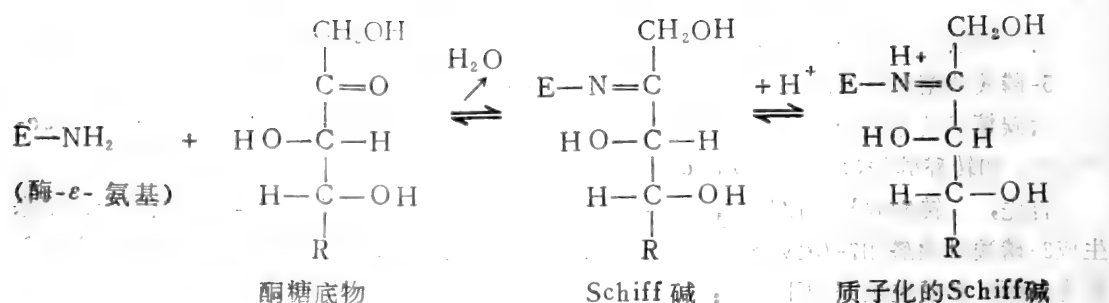


然后，7-磷酸景天庚酮糖 (sedoheptulose-phosphate) 和3-磷酸甘油醛在转醛醇酶的催化下生成6-磷酸果糖和4-磷酸赤藓糖 (erythrose-4-phosphate) (步骤⑦)。转醛醇酶催化转移二羟丙酮基，其反应机制如第408页所示。在转酮醇酶的催化下，另一分子的5-磷酸木酮糖和4-磷酸赤藓糖相互反应生成6-磷酸果糖和3-磷酸甘油醛 (步骤⑧)。反应机制与步骤⑥相同。转酮醇酶和转醛醇酶催化的反应是可逆的。

磷酸戊糖的相互转变以及糖磷酸酯的进一步转化是磷酸己糖支路第二阶段的反应。这一阶段共包括五步反应 (④→⑧)。

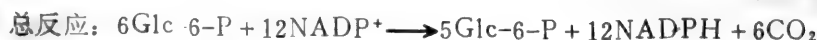
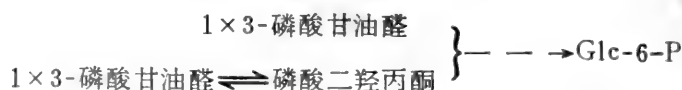
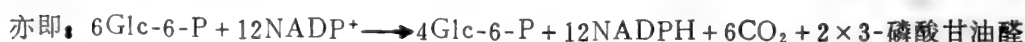
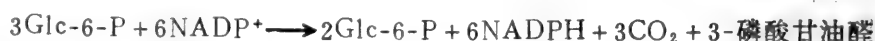
4. 磷酸己糖支路小结

①第一阶段的反应是氧化性的脱氢和脱羧反应，若该途径每次以三分子的 Glc-6-P 开始反应，那么，经过第一阶段的三步反应则可产生六分子的 NADPH、三分子的 CO_2 以及三分子的5-磷酸核酮糖 (Ru-5-P)。



②第二阶段的反应是非氧化性的可逆反应。三分子的5-磷酸核酮糖又可重新转变成二分子的六碳糖和一分子的三碳糖（3-磷酸甘油醛）。

整个磷酸己糖支路的反应可以作如下的总结：



这就是说，若整个反应是由六分子的葡萄糖 6 磷酸开始，那么经过上述两个阶段的反应（见图9-17），有五分子的葡萄糖 6 磷酸重新生成，其净结果导致了一分子的葡萄糖完全氧化（产生了12分子的NADPH和6分子的CO₂）。但是，产生的CO₂并不是来自一分子的葡萄糖 6 磷酸，而是来自六分子的葡萄糖-6-磷酸。

③转酮醇酶催化转移一个二碳单位；转醛醇酶催化转移一个三碳单位。二碳单位或三碳单位的供体总是酮糖，而其受体总是醛糖。

④转酮醇酶和转醛醇酶催化反应的可逆性，使得磷酸己糖支路和酵解途径以及糖异生作用有密切的联系。从磷酸己糖支路的整个反应来看（图9-17），它需要酵解和糖异生等反应过程中的某些酶辅助性地参与反应。例如磷酸己糖（葡萄糖）异构酶、磷酸丙糖异构酶、

醛缩酶以及果糖二磷酸酶等就参与了该反应途径。所以，磷酸己糖支路与糖酵解有密切的关系。几乎所有能进行磷酸己糖支路反应的细胞同时也进行酵解反应。两途径中的有关中间物可以根据细胞内的需要互相进入到对方代谢途径中去。

二、磷酸己糖支路运转的程度及调节

在生物的组织或细胞中，究竟是利用酵解和三羧酸循环的途径来氧化糖，还是利用磷酸己糖支路的途径来氧化糖，以及磷酸己糖支路运转的程度怎样。同位素示踪实验为这一问题的解答提供了很有价值的数据。分别用等量的 $^{14}\text{C}_1$ -葡萄糖和 $^{14}\text{C}_6$ -葡萄糖培养细胞，收集释放的 CO_2 ，并测定带放射性标记的 CO_2 量。若 $^{14}\text{C}_6/^{14}\text{C}_1 = 1$ ，则说明葡萄糖是通过酵解和三羧酸循环被氧化的，若 $^{14}\text{C}_6/^{14}\text{C}_1 < 1$ ，则说明主要是磷酸己糖支路在起作用，或者两者同时存在。在酵解和三羧酸循环中， C_1 和 C_6 、 C_2 和 C_5 、 C_3 和 C_4 均是等量放出，并且放出的顺序是 C_3 和 C_4 、 C_2 和 C_5 、 C_1 和 C_6 。

在动物体内，在不同的组织中，磷酸己糖支路运转程度是不相同的。在脂肪组织和成熟的红细胞中，磷酸己糖支路的活性很高，约占50%；在肝脏中该途径只占5—10%；在骨骼肌和心肌中占5%；在脑中占10%；在甲状腺中占15%；在肺中占15%。

在磷酸己糖支路中，第一个反应是由葡萄糖-6-磷酸脱氢酶催化的一个重要的不可逆反应。在生理条件下，该步反应是很速步骤，控制着该途径的反应速度。最重要的调节因素是 NADP^+ 的水平，它作为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的辅酶和电子的受体起着重要的作用。 NADPH 与 NADP^+ 竞争地同该酶结合，所以 $[\text{NADP}^+]/[\text{NADPH}]$ 浓度比例的变化影响到该酶的活性以及该反应途径的活性。此外， ATP 与葡萄糖-6-磷酸也竞争地同该酶结合。

三、磷酸己糖支路的生物学意义

1. 提供能量

如前面提到的，当一分子葡萄糖经磷酸己糖支路完全氧化时可产生12分子的 NADPH 。在一种特殊酶的作用下，可将 NADPH 上的电子和氢转移到 NAD^+ 上，然后经氧化磷酸化产生36分子的 ATP （按苹果酸一天冬氨酸穿梭系统计算）。除葡萄糖磷酸化时消耗1分子 ATP 外，可净产生35分子的 ATP 。但是，磷酸己糖支路的主要功能不是提供能量。

2. 为生物合成反应提供还原力

磷酸己糖支路所产生的 NADPH 主要是用于还原性的生物合成反应。例如脂酸和胆固醇的合成需要 NADPH 提供还原力。所以，在脂肪和胆固醇合成旺盛的组织中，例如脂肪组织、乳腺、肾上腺皮质等组织中，磷酸己糖支路是比较活跃的。但是，在脂肪合成能力极低的组织中，例如在骨骼肌中，该途径的活性是很低的。

在成熟的红细胞中，磷酸己糖支路也是比较活跃的。该途径产生的 NADPH 可以使谷胱甘肽处于还原状态，而还原性的谷胱甘肽则能阻止不饱和脂酸在红细胞膜上与氧的不正常反应，并能保持血红蛋白的铁原子处于亚铁离子（ Fe^{2+} ）的还原状态。若红细胞内的6-磷酸葡萄糖脱氢酶或该途径中的其他酶缺乏或者无活性，则会导致遗传病，发生溶血现象。

3. 为核酸的合成提供核糖

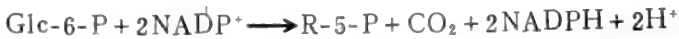
磷酸己糖支路的中间物5-磷酸核糖可以用于核甘酸的合成，而核甘酸是合成核酸的前体。同时，核酸降解产生的核糖也可经此途径被氧化。

此外，4-磷酸赤藓糖亦可为苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的合成提供碳骨架。

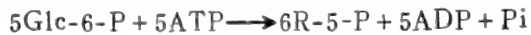
4. 磷酸己糖支路与植物的光合作用密切相关

磷酸己糖支路在植物中普遍存在，它与植物的光合作用有密切的关系。因为该途径中的某些酶和中间物与植物体中固定 CO_2 的 Calvin 循环中的某些酶和中间物是相同的，例如 CO_2 固定的最初受体1,5-二磷酸核酮糖是由5-磷酸核酮糖磷酸化而成的。

前面已指出，磷酸己糖支路与糖酵解以及糖异生有密切的联系。这些代谢途径可以根据细胞对代谢物的需要而彼此配合。例如，如果细胞需要还原力（ NADPH ）并需要为核苷酸的合成提供5-磷酸核糖（ R-5-P ），那么通过磷酸己糖支路的第一步到第四步反应即可达到这一目的。



但是，在细胞需要比 NADPH 更多的5-磷酸核糖的情况下，大多数葡萄糖-6-磷酸经酵解途径转变成果糖-6-磷酸和3-磷酸甘油醛。然后，两分子的果糖-6-磷酸和1分子的3-磷酸甘油醛经磷酸己糖支路 的第八步至第四步反应，即可转变 三分子的5-磷酸核糖。其净结果是：



反过来，核酸降解产生的核糖经磷酸化后亦可经磷酸己糖支路 的第四步至第八步反应产生果糖-6-磷酸和3-磷酸甘油醛。果糖-6-磷酸和3-磷酸甘油醛再经酵解途径进一步降解。

如果细胞需要比5-磷酸核糖更多的 NADPH ，在这种情况下，占优势的是磷酸己糖支路，并与糖异生途径配合，重新产生葡萄糖-6-磷酸，使磷酸己糖支路产生循环。如图9-17和总反应所表示的那样，其结果是细胞获得了更多的 NADPH 。

第四节 糖的异生作用和糖元的合成

前面主要介绍了糖分解代谢途径。本节将介绍动物体内的糖的合成途径。

一、葡萄糖的异生作用

从非糖物质的前体合成葡萄糖的过程叫做葡萄糖的异生作用（*gluconeogenesis*）。这是一条很重要的代谢途径。因为哺乳动物的某些组织，例如大脑和红细胞所需要的能量几乎完全靠葡萄糖的氧化分解提供。尽管在正常的情况下，葡萄糖很容易从糖元降解或从食物中获得，但是，在较长时间饥饿的情况下，葡萄糖的供应受到了极大的限制，因为贮存的糖元已被消耗。为了生存，葡萄糖必须从非糖物质合成。

由于动物体内缺少乙醛酸循环中的两种必需的酶——异柠檬酸裂合酶和苹果酸合酶，所以不能以二碳物作为葡萄糖合成的前体。葡萄糖的主要前体是乳酸、丙酮酸、甘油、生糖氨基酸，以及三羧酸循环的中间物，它们都是三碳以上的化合物。乳酸是由活动着的骨骼肌在酵

解的速度超过三羧酸循环和呼吸链代谢速度时产生的。氨基酸来自食物中的蛋白质，以及在饥饿时由骨骼肌中的蛋白质降解产生的。甘油是脂肪降解时产生的。

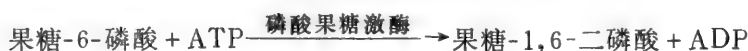
葡萄糖异生作用的主要部位是在肝脏 (liver)。此外，在肾的皮质中也能有限地进行，大约只有肝脏合成葡萄糖的能力的十分之一。葡萄糖的异生作用很少发生在脑、骨骼肌或心肌中。当然，肝脏和肾中所进行的葡萄糖异生作用可以帮助维持血糖的水平，使脑和肌肉从血液中获得足能的葡萄糖，以满足它们的代谢需要。

1. 葡萄糖异生作用不是糖酵解的逆反应

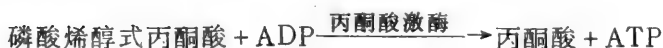
正如葡萄糖转变成丙酮酸的酵解途径是糖分解代谢的主要途径一样，丙酮酸转变成葡萄糖是糖异生作用的主要途径。尽管糖异生途径与糖酵解的逆过程大多数相同，但它们是两个不同的途径。这是因为酵解反应顺序的热力学平衡大大偏向丙酮酸形成的一边，其逆反应在热力学上是不允许的。因而需要另外一种不同的途径即糖异生途径才能将丙酮酸转变成葡萄糖。在酵解反应顺序中，有三个反应步骤在热力学上是不可逆的，这是造成有利于丙酮酸生成的主要因素，也是造成糖异生作用不能沿酵解逆向进行的主要原因。在酵解反应顺序中，自由能的降低主要发生在这三个不可逆反应步骤上，它们分别由己糖激酶、磷酸果糖激酶以及丙酮酸激酶所催化。



$$\Delta G^{\circ'} = -4.0 \text{ Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$$



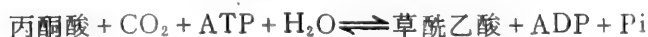
$$\Delta G^{\circ'} = -3.4 \text{ Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$$



$$\Delta G^{\circ'} = -7.5 \text{ Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$$

糖异生作用的化学反应与糖酵解的不同就在这三个可逆反应上。在糖异生作用中，这三个不可逆的反应是通过下面几种方式回避的。

①丙酮酸经草酰乙酸转变成磷酸烯醇式丙酮酸。首先是丙酮酸在丙酮酸羧化酶的催化下羧化转变成草酰乙酸。在此反应中需消耗一分子的 ATP。



$$\Delta G^{\circ'} = -0.5 \text{ Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$$

丙酮酸羧化酶需要生物素作为辅基，乙酰 CoA 是它的别构激活剂 (见第二节)。丙酮酸羧化酶是一种线粒体酶，而糖异生作用的其他酶均存在于胞液中。线粒体内膜对草酰乙酸是不可渗透的，它必须以苹果酸的形式转运到胞液中。草酰乙酸被线粒体内的苹果酸脱氢酶还原为苹果酸。然后苹果酸通过一种载体转运到胞液中，并被胞液中的苹果酸脱氢酶催化重

新氧化成草酰乙酸。

在胞液中存在一种磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶，它能催化草酰乙酸脱羧和磷酸化的反应（见第二节）。



$$\Delta G^{\circ'} = +0.7 \text{Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$$

合并上述反应即可得总反应：



$$\Delta G^{\circ'} = +0.2 \text{Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$$

这一迂回反应途径在热力学上是可行的，因为它的 $\Delta G^{\circ'}$ 只是 $+0.2 \text{Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ ，与丙酮酸激酶催化的逆反应相比（逆反应的 $\Delta G^{\circ'} = +7.5 \text{Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ ）所输入的自由能要少得多。ATP 和 GTP 降解产生的能量输入到磷酸化合物磷酸烯醇式丙酮酸分子中（需要输入 $+14.8 \text{Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ ）。

磷酸烯醇式丙酮酸转变成果糖-1,6-二磷酸的反应与酵解反应顺序中的那几步逆反应完全相同。

②果糖二磷酸酶催化果糖-1,6-二磷酸转变成果糖-6-磷酸。沿糖异生途径产生的果糖-1,6-二磷酸不可能在磷酸果糖激酶的催化下转变成果糖-6-磷酸。这一不可逆反应却可以在果糖二磷酸酶（fructose diphosphatase）的催化下进行。



$$\Delta G^{\circ'} = -3.9 \text{Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$$

果糖二磷酸酶催化时需要 Mg^{2+} 。该酶是一种调节酶，受到多种因素的控制。AMP、果糖-2,6-二磷酸等是它的有效抑制剂；而 ATP 是它的正调节效应物。

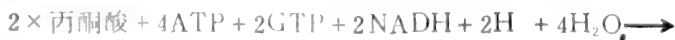
③葡萄糖-6-磷酸酶催化葡萄糖-6-磷酸水解产生葡萄糖。上面生成的果糖-6-磷酸经磷酸葡萄糖异构酶的催化转变成葡萄糖-6-磷酸。在酵解中，由己糖激酶催化产生葡萄糖-6-磷酸的不可逆反应，在糖异生作用中却可以被葡萄糖-6-磷酸酶（glucose 6-phosphatase）水解，使其转变成葡萄糖。



$$\Delta G^{\circ'} = -2.9 \text{Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$$

该酶存在于脊椎动物肝细胞内质网上，作用于位于胞液中的底物。但该酶不存在于脑和肌肉组织中，因而这些组织不可能为血液供应游离的葡萄糖。

综观由丙酮酸经异生途径转变成葡萄糖的全过程（图9-18），我们可以看出，总共要消耗六个高能磷酸基，并用去两分子的 NADH ：





$$\Delta G^{\circ'} = -9\text{Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$$

但是,葡萄糖经酵解转变成丙酮酸只净产生两分子的ATP。因此,由丙酮酸合成葡萄糖是一种代价很高的过程。这种高昂的代价是将能量上不利的过程(糖酵解的逆反应,

$\Delta G^{\circ'} = +20\text{Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$)转变成能量上有利的过程(糖异生, $\Delta G^{\circ'} = -9\text{Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$)所必需的。

2. 丙酮酸的前体或磷酸烯醇式丙酮酸的前体转变成葡萄糖

不仅丙酮酸能转变成葡萄糖,而且凡能转变成丙酮酸或磷酸烯醇式丙酮酸的前体都可以转变成葡萄糖。

(1) 乳酸是重要的非糖物质前体

骨骼肌在剧烈运动时,因氧和葡萄糖的供应受到限制,肌糖元降解并酵解,产生肌肉收缩所需要的能量,但同时也产生大量的乳酸。乳酸通过扩散透过质膜进入血液,并经循环着的血液被肝脏吸收。在肝脏中,乳酸在肝脏型乳酸脱氢酶的催化转变成丙酮酸。然后经糖异生作用转变成葡萄糖。大部分葡萄糖又可返回的骨骼肌中,以糖元的形式贮存起来(在休息时)。

(2) 三羧酸循环的中间物是磷酸烯醇式丙酮酸的前体

三羧酸循环的中间物 柠檬酸、异柠檬酸、 α -酮戊二酸、琥珀酸和苹果酸等在循环中都可以转变成草酰乙酸,而草酰乙酸可在磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶的催化下转变磷酸烯醇式丙酮酸。后者沿糖异生途径进一步转变成葡萄糖。

(3) 大多数氨基酸也是糖异生作用的前体

蛋白质降解产生的氨基酸大多数都可以转变成丙酮酸或三羧循环的中间物(见第十二章)。例如,丙氨酸、丝氨酸、半胱氨酸、甘氨酸等可以转变成丙酮酸;谷氨酸、谷酰胺、脯氨酸、精氨酸、组氨酸等都可以转变成 α -酮戊二酸;天冬氨酸可以转变成草酰乙酸。这些氨基酸都是丙酮酸和磷酸烯醇式丙酮酸的前体,可以沿糖异生途径转变成葡萄糖。因此,通常把这些氨基酸叫做生糖氨基酸(glucogenic amino acids)。

3. 糖异生作用和糖酵解是交互调节的

糖异生作用的第一个控制点是由丙酮酸羧化酶催化的反应,如前所述,乙酰CoA是该酶的正调节效应物,在乙酰CoA缺乏时,该酶是无活性的。每当乙酰CoA过量时,表明它超过了柠檬酸合成的需要,因而乙酰CoA就抑制丙酮酸脱氢酶复合物的活性,降低乙酰CoA合成的速度。同时乙酰CoA刺激丙酮酸羧化酶的活性,引发糖异生反应。

糖异生作用的第二个控制点是果糖二磷酸酶催化的反应。当细胞需要能量时,其信号是[AMP]/[ATP]的比例升高,AMP刺激磷酸果糖激酶的活性,同时抑制果糖二磷酸酶的活性,从而有利于糖酵解。当细胞含有丰富的能量时,其信号是ATP、柠檬酸的水平升高。ATP和柠檬酸是磷酸果糖激酶的别构抑制剂,同时也是果糖二磷酸酶的激活剂。在这种情况下,糖酵解被抑制而有利于糖异生作用。

如前所述,Fru-2,6-P₂是磷酸果糖激酶最重要的激活剂(见第一节),它也是果糖二磷酸酶的重要抑制剂,但抑制作用是不完全的。只有当葡萄糖的量超过肝脏贮存糖元的能力

时，才引起己糖-6-磷酸和 Fru-2,6-P₂ 水平的升高，从而刺激酵解或引起无效循环（futile cycle）。当饥饿时，或急需葡萄糖时，糖元被耗尽，葡萄糖必需通过异生作用来补充，以满足肌体对葡萄糖的需要。这时，因Fru-2,6-P₂的水平很低，不能对果糖二磷酸酶造成抑制，从而刺激糖的异生作用，产生葡萄糖。

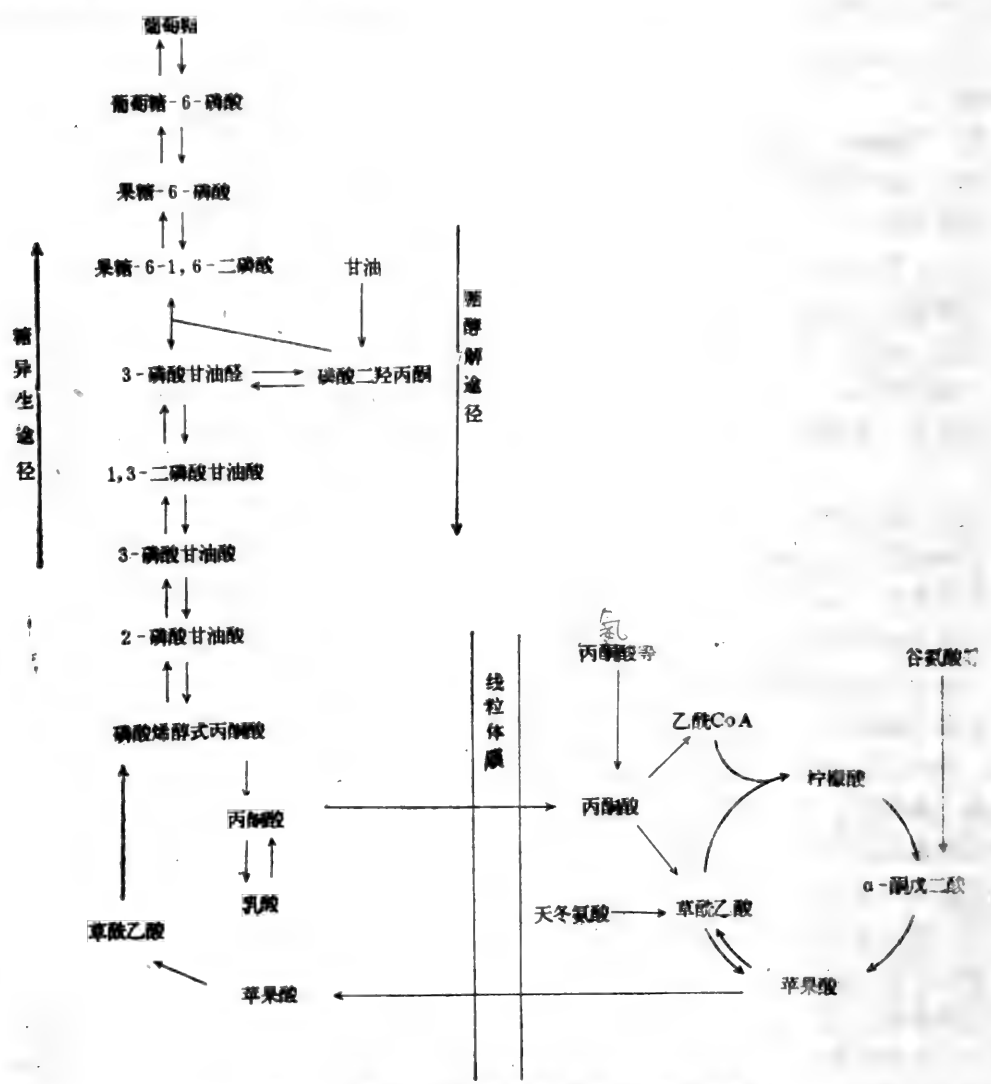


图9-18 糖异生作用与糖酵解是两个相反的过程

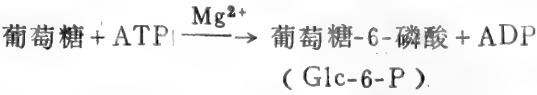
已知胰高血糖素和肾上腺素等激素对糖代谢有很大的影响。胰高血糖素或肾上腺素除控制糖元磷酸化酶和糖元合成酶的活性外（见第七章），胰高血糖素还能抑制肝糖元的酵解，并促进肝脏糖异生（肾上腺素除促进肝糖元降解外，还能促进肌糖元的降解和酵解）。胰高血糖素的这种作用是两方面的原因造成的。一方面它刺激磷酸果糖激酶的磷酸化，磷酸化后的磷酸果糖激酶降低了对 Fru-2,6-P₂ 的亲合力；另一方面它降低了 Fru-2,6-P₂ 的水平，这种降低是通过果糖-6-磷酸 2-激酶的磷酸化而失活，以及果糖-2,6-二磷酸酶的磷酸化而

激活实现的。胰高血糖素的这些综合影响导致了对磷酸果糖激酶的强烈抑制，从而促进糖异生作用。

二、糖元的合成

在动物体内，糖元实际上在所有组织中都能合成，但主要是在肝脏和骨骼肌中进行。糖元的合成并不是糖元降解的逆反应，即不是说不是糖元磷酸化酶催化的逆反应。1957年，阿根廷生物化学家 L. Leloir 证明糖元的合成是通过一种不同的途径完成的，糖基供体是尿苷二磷酸葡萄糖而不是葡萄糖-1-磷酸。现在了解到，在生物系统中，生物合成途径和降解途径几乎总是不同的。糖元代谢为这个原则提供了第一个例子。分开进行的途径为在能量上和控制上提供了更大的灵活性。

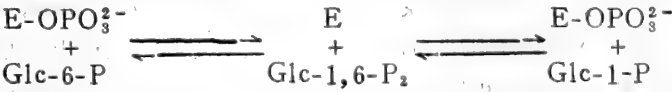
糖元合成的第一步是葡萄糖的磷酸化。该步反应是由己糖激酶或葡萄糖激酶催化的：



接着发生的反应是 Glc-6-P 转变成 Glc-1-P。磷酸葡萄糖变位酶催化这一可逆的反应：

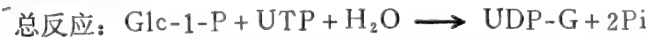


这一可逆的转变需要先形成中间物葡萄糖-1,6-二磷酸，该酶催化反应的机制是：



磷酸葡萄糖变位酶的活性形式是，在它的活性中心部位的丝氨酸残基被磷酸化。

上面的反应生成的 Glc-1-P 在葡萄糖-1-磷酸尿苷酰转移酶 (glucose-1-phosphate uridylyltransferase) 的催化下形成尿苷二磷酸葡萄糖 (简称 UDPG)。



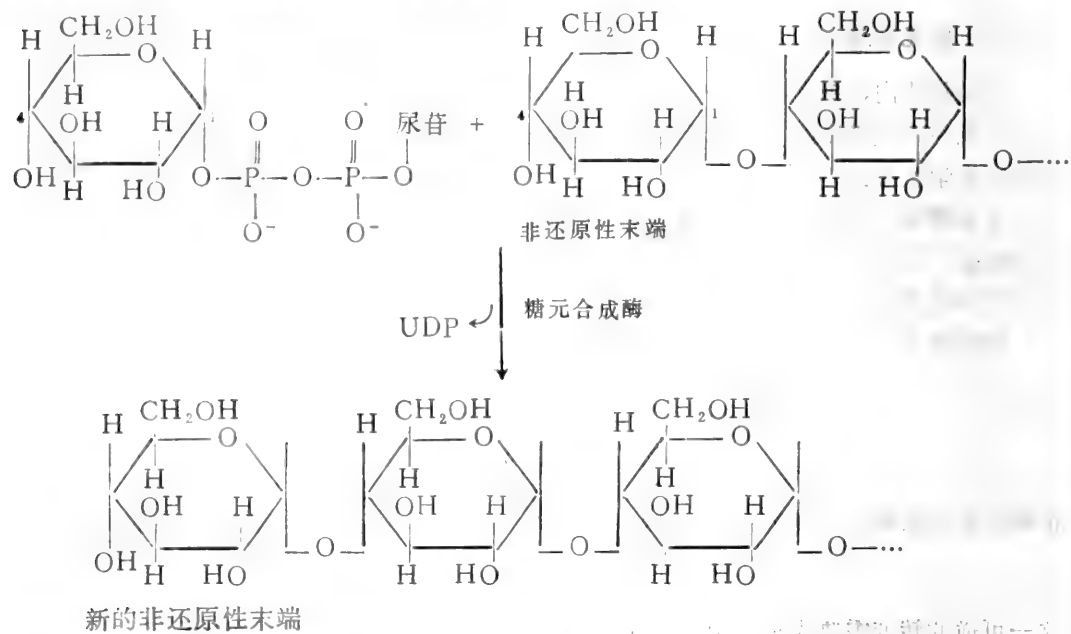
该步反应是糖元合成中的一步重要反应。这步反应是可逆的，但由于焦磷酸的水解 (由焦磷酸酶催化) 推动了反应向右进行，从而变得不可逆了。在生物化学上，许多生物合成反应因焦磷酸的水解而变得不可逆。UDP-G 是糖元合成的葡萄糖残基的中间供体，是葡萄糖的激活形式。

下一步反应由糖元合成酶催化。在糖元合成酶的作用下，UDP-G 的葡萄糖转移到引物 (primer) 分子的非还原性末端 (nonreducing end) 上。形成新的 $\alpha(1 \rightarrow 4)$ 糖苷键。



糖元合成酶催化糖元的合成需要引物。引物可以是 $\alpha(1 \rightarrow 4)$ 多聚葡萄糖或有分枝的 (至少

有四个糖残基的)小分子糖元。糖元合成酶可以把 UDP-G 的葡萄糖基连续地转移到引物的非还原性末端上(末端糖基的 C₄ 位的羟基), 并产生新的非还原性末端。



糖元合成酶不能产生新的分枝。分枝的形成是在分枝酶(branching enzyme) (也叫做糖基- (4→6) -转移酶) 的催化下进行的。该酶能从糖元的分枝点上的非还原性末端催化 6-7 个葡萄糖基转移至糖元分子中更内部的一个糖残基的 C₆ 位上, 形成 α (1→6) 糖苷键, 产生出新的非还原性末端。葡萄糖基又可通过糖元合成酶加到新的非还原性末端上。

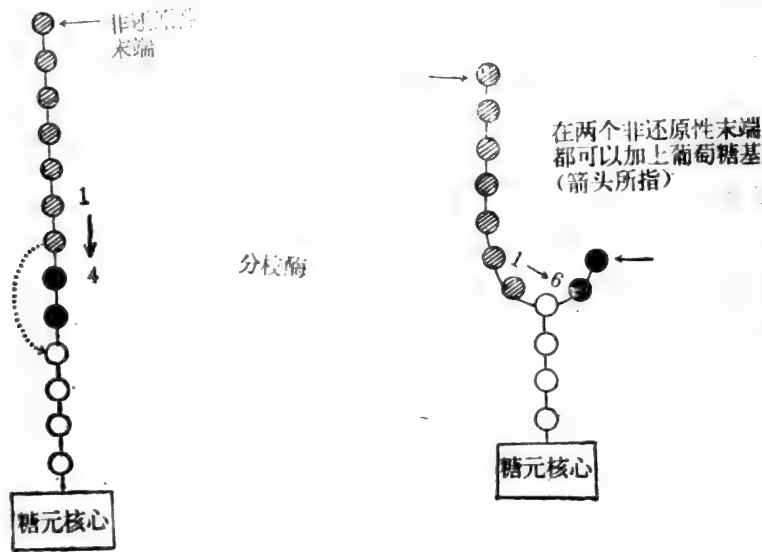


图9—19 分枝酶作用示意图

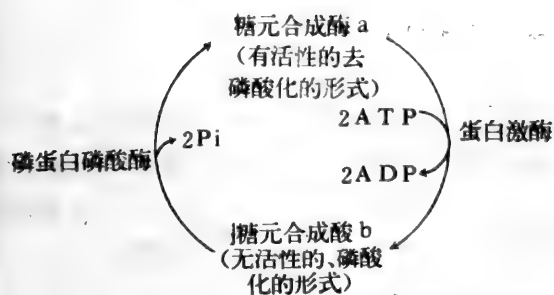


图9—20 糖元合成酶的 a 形式和 b 形式的转换

元合成酶和糖元磷酸化酶是互交调节的。当一种酶因磷酸化而失活时（糖元合成酶），一种酶则因磷酸而激活（糖元磷酸化酶）。（图9—21）

糖元合成酶也是一种别构调节酶。它的低活性的 b 形式受 Glc-6-P 的调节。在 Glc-6-P 的刺激下，b 的活性升高（仍是磷酸化的形式）。所以糖元合成酶 b 又叫做糖元合成酶 D。糖元合成酶 a 的活性不受 Glc-6-P 的影响，因此它又叫做糖元合成酶 I。

糖元的合成与降解的速度受激素的控制。当血糖浓度升高时，刺激胰岛素的分泌。胰岛素能促进肝脏合成糖元。肾上腺素和胰高血糖素的作用与胰岛素相反，这两种激素刺激糖元的降解而抑制糖元的合成。这两激素作用的机制见七第章。

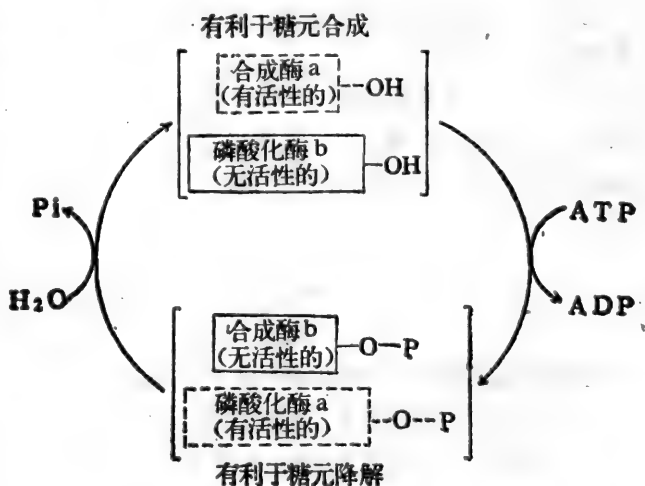


图9—21 糖元合成酶和糖元磷酸化酶的交互调节

第五节 光合作用

一、引言

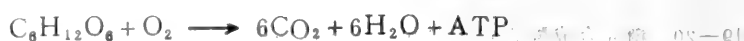
生命活动所需要的能量最初都来自太阳能（solar energy），太阳能通过光合生物的光合作用（photosynthesis）能够转变成生物能（biomass）。光合生物主要包括绿色植物和光合微生物。光合作用是光合生物利用太阳能将 CO_2 和某种还原剂（在绿色植物中是 H_2O ）合成糖的过程（在绿色植物中还能释放出 O_2 ）。

有两类光合生物，一类是绿色植物和蓝细菌，另一类是光合细菌。

绿色植物和蓝细菌（cyanobacteria）是利用 H_2O 作为电子的供体，并产生 O_2 。其光合作用总反应可以简单地表达为：

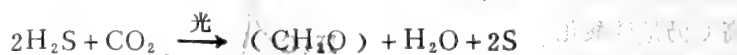


在这类光合生物中，它们能利用太阳能将贫能的 CO_2 和 H_2O 转化成富能的糖和其他有机物，同时将 O_2 释放到大气中。需氧的异养生物（包括人类）却与此相反，它们能利用光合作用释放的氧，把光合生物提供的富能的有机物降解氧化成 CO_2 和 H_2O ，同时产生它们生命活动需要的能量——ATP。所产生的 CO_2 释放到大气中，又可被光合生物作用。



可见光合生物与异养生物就是生活在这样一种相互依存的共生圈中。这个共生圈处在一种平衡的稳态状态中。

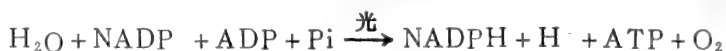
光合细菌不能利用 H_2O 作为电子的供体，并且不产生氧。实际上，许多光合细菌是厌氧的，氧对它们反倒有害。某些光合细菌是以简单的无机化合物作为电子的供体，例如绿色硫细菌是以 H_2S 作为电子的供体。



有些光合细菌能利用有机化合物（例如乳酸）作为电子的供体。

所有光合生物的光合作用过程都基本上相似。本节主要介绍绿色植物的光合作用。

在植物中，光合作用可区分为两个不同的反应阶段，即光反应和暗反应。在光反应（light reaction）阶段中，太阳能首先被光吸收色素（光受体分子）捕获，然后将其以 ATP 和 NADPH 的形式转变成化学能，同时释放出 O_2 。所以光反应可表达为：



在暗反应（dark reaction）中，在酶的催化下，将光反应产生的 NADPH，在 ATP 供能的情况下，使 CO_2 还原成简单的糖类。所以暗反应可表达成，



光合作用的主要产物是 D-葡萄糖，它以淀粉（starch）的形式存贮存在植物体内。

在植物体内，光合作用是发生在细胞内特殊的细胞器叶绿体（chloroplast）中。在高等植物的一个细胞中，大约含有40个以上的叶绿体，而某些光合藻类一般只含一个叶绿体。光反应是发生在叶绿体中的类囊体（thylakoid）和基质片层（stromal lamellae）的膜上，光吸收色素就位于其上。暗反应则发生在叶绿体可溶性基质（stroma）中。

在光合细菌和蓝细菌中没有叶绿体存在，它们的光合作用装置位于细胞膜上，

二、光吸收色素

光合作用是由光吸收色素受光激活而开始的。光吸收色素可分为两类，一类是主要色素，即叶绿素；另一类是辅助色素如胡萝卜素等。

1. 叶绿素 (chlorophylls)

在高等植物中，主要的光吸收色素是叶绿体 a 和 b，它们通常是(但不总是)呈绿色。这两种叶绿素分子的结构基本相同(图9—22)。它们的区别是，叶绿素 a 在环 I 的 C₃ 位上是甲基，而叶绿素 b 在该位置上是一个醛基。叶绿素是含镁的卟啉，其结构与铁卟啉不同。叶绿素分子环 IV 上的丙酸与由四个类异戊二烯单位构成的叶绿醇 (phytol) 酯化形成叶绿素的疏水侧链。叶绿素 a 和 b 的吸收波长位于可见光区 (400—700nm) 内，两者的吸收光谱相似，但可区别 (图9—23)，叶绿素 a 总是存在于产生 O₂ 的光合细胞中。在所有绿色植物中，几乎都可以找到叶绿素 a 和 b。在褐藻和硅藻等藻类植物中，存在叶绿素 a 和 c。在氰细菌中只有叶绿素 a。在光合细菌中，因不产生氧，所以没有叶绿素 a，但含有与叶绿素 a 不同的细菌叶绿素 a 和 b。

2. 辅助色素 (accessory pigments)

在类囊体膜上，除含有主要色素叶绿素外，还含有另一类色素。它们吸收光能后必须转移给叶绿素。故称辅助色素。在高等植物中，辅助色素是类胡萝卜素。最主要的是 β-胡萝卜素 (β-carotene) (它是动物体内维生素 A 的前体) 和叶黄素 (xanthophyll)，其颜色有红的、黄的或紫的。类胡萝卜素在可见光内的吸收波长与叶绿素不同 (图9—23)。由于有类胡萝卜素的存在，因而可以使光合植物在更大范围内吸收可见光。在红藻和蓝绿藻中所含的辅助色素是藻胆色素。

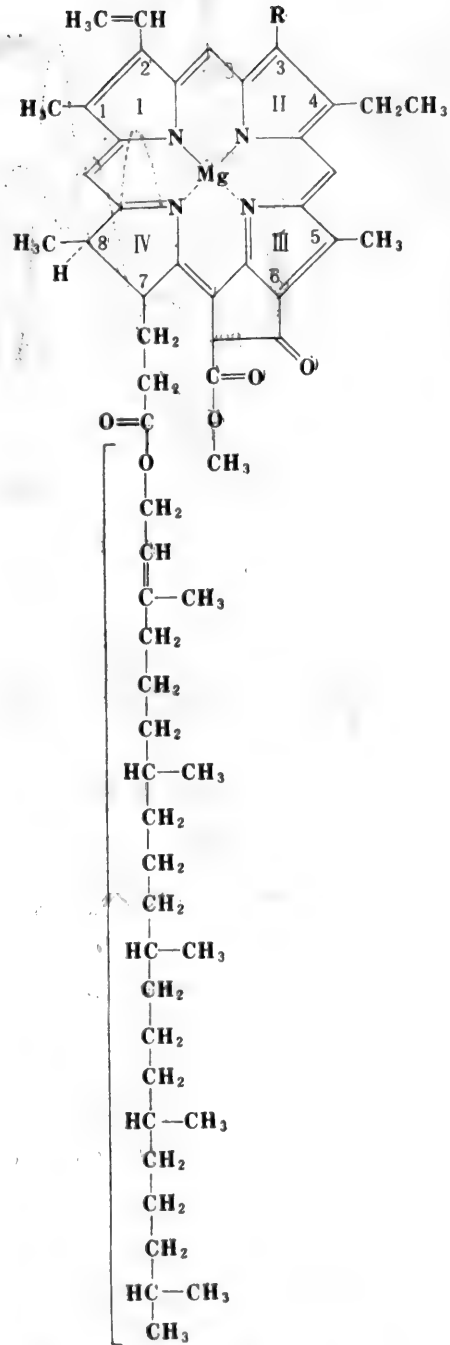


图9—22 叶绿素 a 和 b 的结构
在 a 中 R 为 CH₃，在 b 中 R 为 CHO

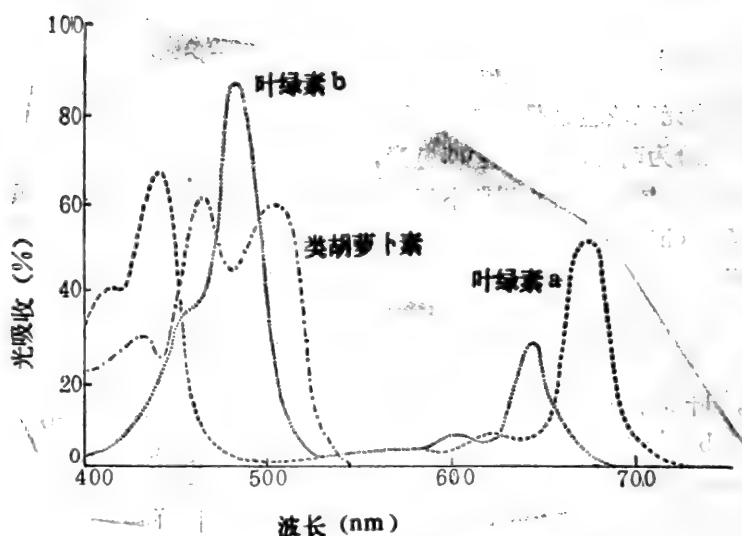


图9-23 叶绿素 a、b 以及类胡萝卜素的吸收光谱

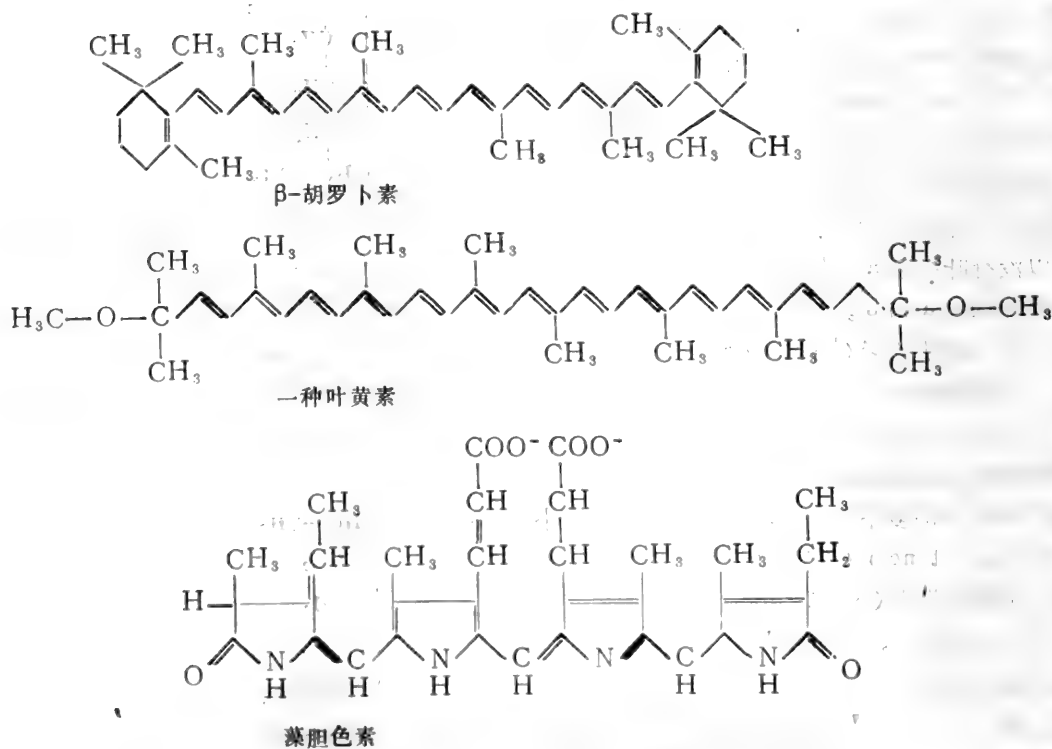


图9-24 β -胡萝卜素、叶黄素以及藻胆色素的结构

三、光反应

1. 色素分子的激活

排列在类囊体膜上的光吸收色素分子组合成功能单位,即所谓光合系统(photosystem)。在所有绿色植物和藻类中的光反应,都涉及两个光合系统(Ⅰ和Ⅱ)。虽然在捕获光能($h\nu$)和将电子转移给受体分子方面是相似的,但它们是叶绿体中的两个光合成单位。这两个系统的光合作用活性通过电子转移系统而相联系与合作(图9—25),并且通过光反应产生 NADPH 和 ATP 而有效地协调。

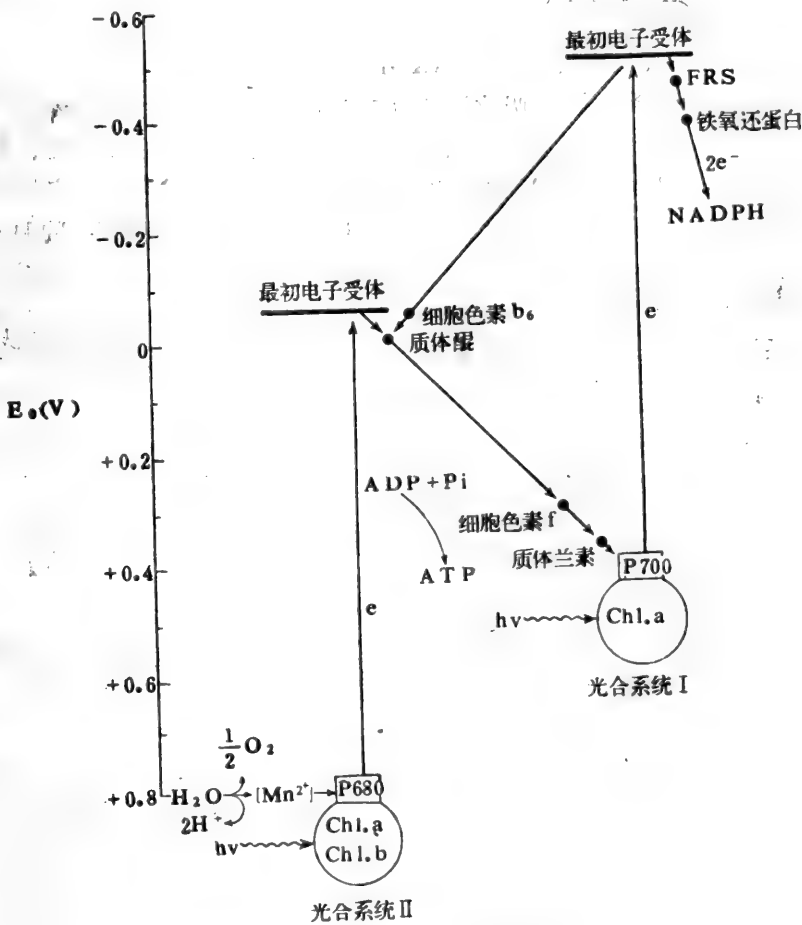


图9—25 光合作用两个光反应过程

虽然,光合系统Ⅰ和Ⅱ主要受低于 680nm 的光激活,但光合系统Ⅰ可被波长更长的光(直到 700nm)激活。光合系统Ⅰ和Ⅱ分别与产生 NADPH、ATP 和 O_2 的反应有关。光合细菌不产生氧,只有一个光合系统。在每个光合系统中,只有一个特殊的叶绿素分子能将光能转变成化学能。这个叶绿素分子与一种特殊的蛋白质结合在一起,形成光合系统的反应中心(reaction center)。在光合系统Ⅱ中是 P_{680} (P 代表 Pigment “色素”),写在右下边的数字表示最大吸收时的波长)。

在叶绿体中,叶绿素分子的浓度比光合系统任何其他中间物的浓度都高得多。对每个光反应来说,大约有 80—400 个叶绿素分子以高度组织化的方式紧密地包装在反应中心周围。当

一个光收获叶绿素 (light-harvesting chlorophyll) 捕获一个光子时, 它便被激活, 即它的一个电子上升到激发态。这种激发很快转移给其他近邻的叶绿素分子, 直到它到达反应中心的 P_{700} 或 P_{680} 。由于 P_{700} 和 P_{680} 只需要较低的能量就可激发, 所以这种传送的能量有效地使这两个色素分子中的任何一个转变为激发状态。在这种激发态中, 一个电子可被迁移。于是, 被激发的色素变成了氧化态 (P_{700}^+ 和 P_{680}^+)。在光化学反应中, P_{700} 或 P_{680} 被激发的一瞬间, 便发生了光能向化学能转变的事件。

2. 光合系统 I (光反应 I) 产生 NADPH

在光照条件下, 光合系统 I 吸收波长为 700nm 以下的光, 光收获 (或称天线) 分子 (包括叶绿素和辅助色素) 将捕获的光能传递到反应中心, 使反应中心的色素分子 P_{700} 激活, 转变成激发态。 P_{700} 是一个特殊环境下的叶绿素 a, 如前所述, 它与一个特殊的蛋白结合形成复合物。处在激发状态的 P_{700} 的标准氧化还原电势由基态的 +0.4 伏上升到 -0.5 伏。这种高能状态允许 P_{700} 供出一个高能电子给最初的电子受体 X (尚未鉴定出)。然后通过一个电子传递系统, 将电子交给 $NADP^+$, 从而形成 NADPH。这个电子系统包括铁氧还原蛋白还原物 (FRS) 和铁氧还蛋白。来自最初受体上的电子经铁氧还蛋白还原物转移到铁氧还蛋白上。然后在铁氧还蛋白 - $NADP^+$ 氧化还原酶催化下, 将电子从铁氧还蛋白转移到 $NADP^+$ 上, 产生 NADPH。铁氧还蛋白是一种铁-硫蛋白, 含有两个铁-硫中心。铁氧还蛋白 - $NADPH^+$ 氧化还原酶是一黄素蛋白 (辅基是 FAD)。

在光合系统 I 中, 由于 NADPH 的合成, 结果使 P_{700} 变成了氧化型 (P_{700}^+)。在该系统再次被激活之前, 必须得到一个电子。

3. 光合系统 II (光反应 II) 为光合系统 I 提供电子

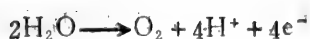
光合系统 II 的关键性的作用是为光合系统 I 被氧化的 P_{700} 供给电子, 使其恢复到原来的基态。这里有一个电子传递系统, 把两个光反应连接起来, 并且在电子传递过程中伴随 ATP 的生成 (图9—25)。

在光照的条件下, 光合系统 II 吸收波长为 680nm 以下的光, 通过与光合系统 I 相类似的机制使 P_{680} 转变为激发态。光合系统 II 的叶绿素分子是 a 和 b, 叶绿素 b 将它的激发能量经叶绿素 a 传送给 P_{680} 。 P_{680} 转变为激发态时, 其标准电势由基态的 +0.82 伏上升到 -0.05 伏。这样, 就允许 P_{680} 把一个高能水平的电子转移给最初的电子受体 Q 物质 (可能是苯醌)。然后电子经过一个传递系统交给缺电子的 P_{700} (图9—25)。该电子传递系统的三个已知的组分是质体醌、植物细胞色素 f 和一种铜蓝蛋白——质体蓝素。

4. 氧的产生和 P_{680} 的还原

当光合系统 II 的 P_{680} 因受光激发, 所释放的电子经电子传递系统提供给光合系统 I 的 P_{700} 后, 本身则失去电子而被氧化。被氧化的 P_{680} 必须重新接受电子, 恢复原初的基态, 才能再接收光能, 重复前面的过程。

虽然目前仍不清楚为失电子的 P_{680} 提供电子的直接供体, 但已知光合系统 II 与 H_2O 的光氧化密切相关, 而且 H_2O 分子是光合作用的电子来源。因此, 很可能是这样一种情况, 即这种尚未鉴定出的直接电子供体为 P_{680} 供出电子之后本身转变成一种强氧化剂。这种强氧化剂使 H_2O 分子裂解产生电子并放出氧:



当它接受来自 H_2O 分子的电子之后被还原，又可作为还原剂为 P_{680} 提供电子。由此可见， H_2O 分子裂解的原动力来自光合系统Ⅱ受光激发所致。因此上面 H_2O 分子的裂解反应被称为 H_2O 的光氧化（光解反应）。业已证实 H_2O 的光氧化需要 Mn^{2+} 。在 $\text{pH} 7.0$ 时， $\text{Mn}^{3+}/\text{Mn}^{2+}$ 的 $E_0' = +1.5$ 伏，而 $\frac{1}{2}\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ 的 $E_0' = +0.82$ 伏。所以，强氧化剂很可能是一种含锰的蛋白复合物。

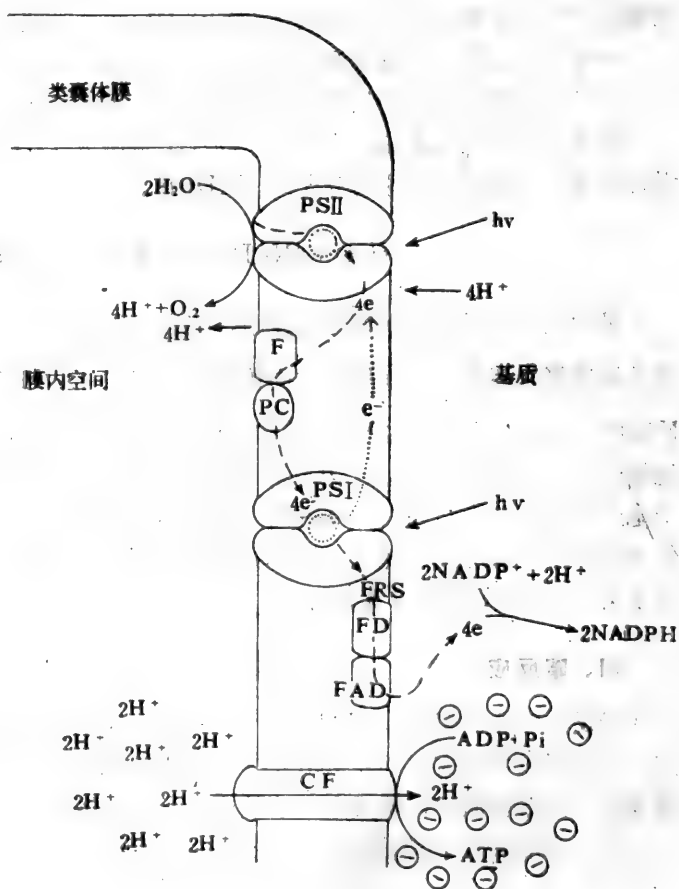
5. 光合磷酸化

在光反应中，由激发态的色素分子发出的电子沿电子传递系统传递时所释放出的能量推动 ADP 磷酸化生成 ATP 的过程叫做光合磷酸化 (photophosphorylation)。光合磷酸化的机制与氧化磷酸化的机制相类似。当电子由光合系统Ⅱ的最初电子受体经传递系统到达光合系统Ⅰ时，引起质子 (H^+) 在类囊体膜内空间积累，从而产生一种跨类囊体膜的质子梯度，这种质子梯度是推动 ATP 合成的电化学推动力（如图9—26所示）。

根据光合作用的实际需要，电子沿传递系统可以进行非循环式和循环式两种方式的传

图9—26 光合系统Ⅰ和Ⅱ以及光合磷酸化图解

PSⅠ和Ⅱ代表两个光合系统；
 $h\nu$ 代表光能，PQ代表质体醌，
 f为细胞色素I，PC为质体蓝素，
 FRS代表铁氧还蛋白还原物，
 FD为铁氧还蛋白，FAD代表
 铁氧还蛋白-NADP⁺氧化还原
 酶，CF代表偶联因素（一种
 ATP合成酶）。



递。因此，光合磷酸化也有两种不同的方式，即非循环式和循环式光合磷酸化(图 9—25)。

(1) 非循环式光合磷酸化

由光合系统Ⅱ的反应中心 P_{680} 激发出的电子经电子传递系统传至光合系统Ⅰ的反应中心 P_{700} ，再由 P_{700} 激发出电子并用于 $NADP^+$ 的还原。电子不再返回到原发位置 (P_{680})，在电子由光合系统Ⅱ的最初电子受体传递到光合系统Ⅰ的 P_{700} 的过程中伴随 ATP 的合成。这就是非循环式光合磷酸化。

非循环式光合磷酸化的特点是：电子传递涉及两个光合系统，电子沿传递系统走了“Z”形路线(图 6—25)之后用来还原 $NADP^+$ ，失去电子的 P_{680} 从 H_2O 的光解反应中重新获得电子。

(2) 循环式光合磷酸化

当 $NADP^+$ 不足(即 $NADPH$ 的水平很高)时，由光合系统Ⅰ反应中心 P_{700} 激发出的电子可选择另外一种电子传递方式，即循环式电子传递。在此传递方式中，电子不是用于 $NADP^+$ 的还原，而是经光合系统Ⅰ的最初电子受体传递至细胞色素 b_6 ，再经质体醌、细胞色素 f 和质体蓝素返回到 P_{700} ，从而形成一个循环式的电子传递路线。在电子传递过程中释放的能量推动着 ATP 的合成(图 9—25)。这就是所谓的循环式光合磷酸化。

一般认为，当绿色植物细胞含有很丰富的 $NADPH$ 、但需要能量(ATP)时，就会出现循环式的电子流动和光合磷酸化。光合细胞的这种调节机制目前很少为人所知。

循环式光合磷酸化只涉及到光合系统Ⅰ，而且不涉及 $NADPH$ 的形成，也没有 O_2 的产生。

在光合细菌中，由于只存在光合系统Ⅰ，因而 ATP 是在循环式的电子流动中产生的。

综观上述两个光反应，当一分子的 O_2 从两分子 H_2O 的光解反应中产生时，通过两个光合系统，总共可以产生两分子的 $NADPH$ 。



虽然上面的反应出现在光反应中，但它不服从热力学原则。按照热力学的观点，电子总是沿标准氧化还原电势递增的方向传递的。因 $\frac{1}{2}O_2/H_2O$ 的 E'_0 为 +0.82 伏，而 $NADP^+/NADPH$ 的 E'_0 为 -0.32 伏，上面的反应要想进行，就必须输入能量。由于在光反应中，光能输入到了光反应系统中，从而推动了热力学上不利的 $NADP^+$ 的还原反应。然而，在每个电子传递系统中，如在图 9—25 中指出的，电子的传递是服从热力学原则的。所以在电子传递过程中能够释放出能量，并推动 ATP 的合成。也就是说，在光反应中，输入的光能转变成了富能的 $NADPH$ 和 ATP。

四、暗反应

光反应产生的还原物 $NADPH$ 经一系列的酶催化，将 CO_2 还原成单糖的过程称暗反应。在暗反应中所需要的能量由光反应产生的 ATP 提供。在绿色植物中，暗反应发生在叶绿体的可溶性基质中，暗反应在暗处或有光的条件下都能进行。

CO_2 被固定并还原成糖的一系列生物化学反应是 M. Calvin 及其助手揭示出来的。这一系列的反应构成了一个循环，称为三碳循环或 Calvin 循环(图 9—27)。他们将 ^{14}C -标

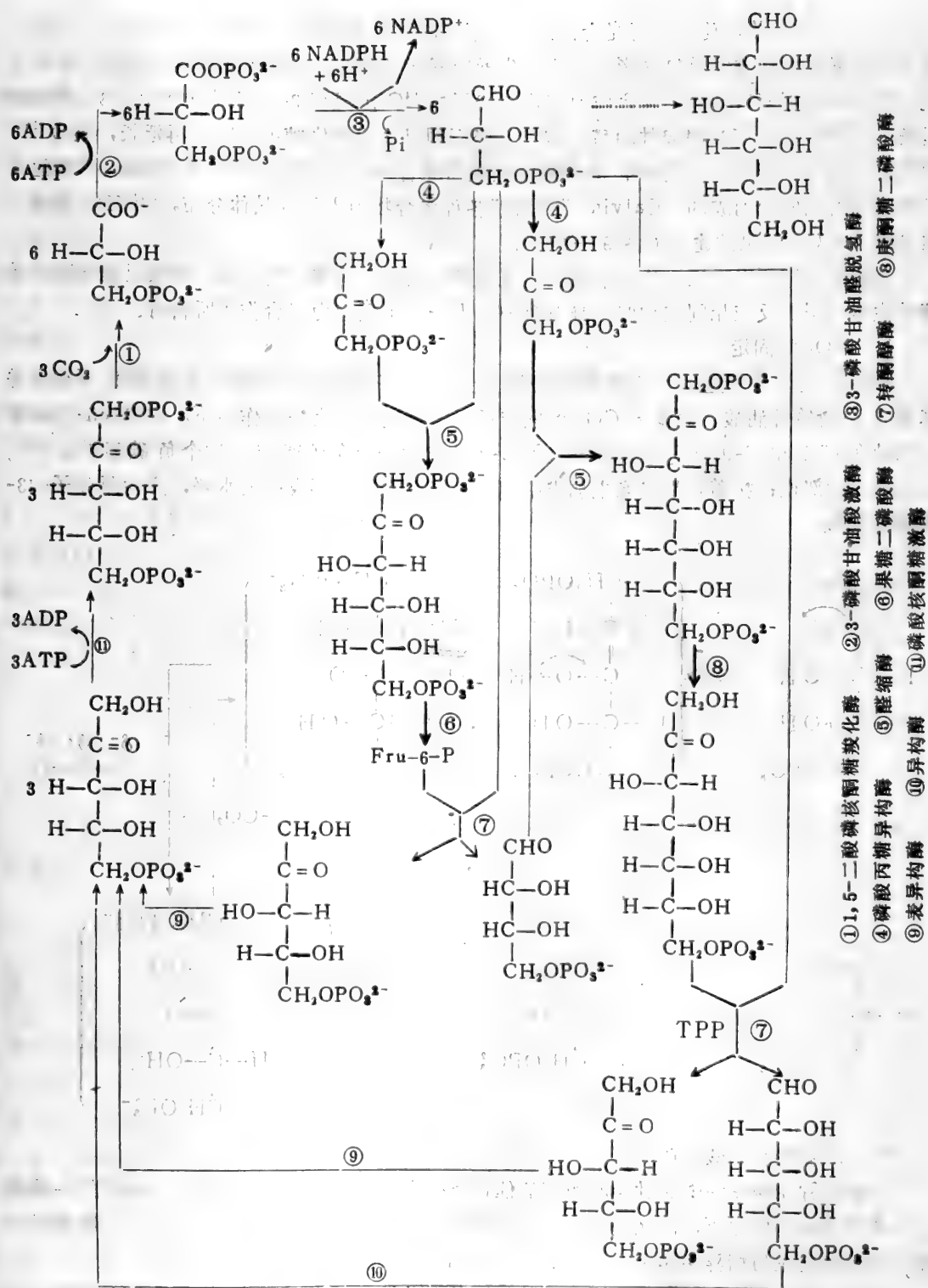


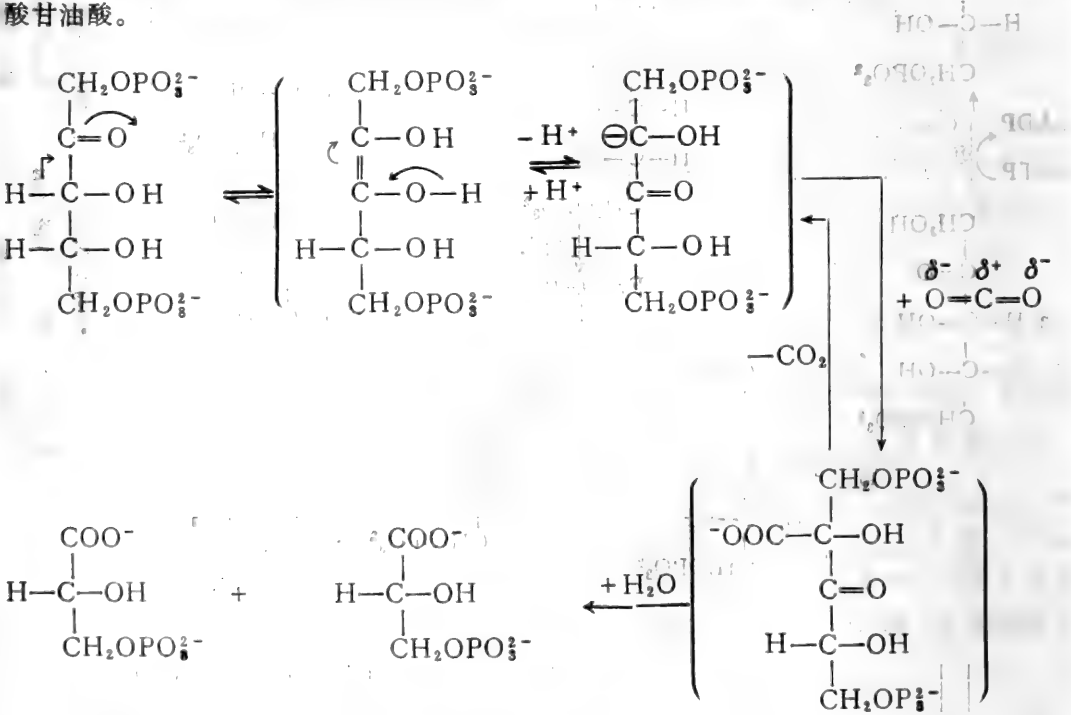
图 9-27 三碳循环的反应过程。

记的 CO_2 给与植物，使之进行光合作用，在不同时间内快速使细胞致死，提取出生成物，采用双向纸层析和放射性自显影的方法，分析出不同时间内含放射性的代谢中间物。结果发现，在20秒或更短时间内，光合作用产物中90%的 ^{14}C 出现在 3-磷酸甘油酸中。如果时间延长，则 ^{14}C 出现在3-磷酸甘油醛、磷酸二羟丙酮以及磷酸化糖中。时间再延长，则含 ^{14}C 的有机物更多。因此，他们断定 3-磷酸甘油酸是光合作用暗反应的第一个产物，而其他有机物都是由它转变而成的。Calvin 还探讨了各种化合物中 ^{14}C 的具体分布，并在此基础上推论出了 CO_2 固定的途径（图 9—27）。

从图 9—27可以看出，在整个循环中有许多中间反应步骤与糖酵解、磷酸己糖支路以及糖异生等过程的反应相同或相似，唯有第一、十一两步反应为光合作用所特有。

1. CO_2 的固定

CO_2 的受体分子是1,5-二磷酸核酮糖，它在1,5-二磷酸核酮糖羧化酶的催化下羧化并水解成 3-磷酸甘油酸。此步是 CO_2 的固定反应。在这个羧化酶的作用下，首先1,5-二磷酸核酮糖在 C-2 和 C-3 位发生烯醇化，在 C-2 位产生一个负碳离子。这个负碳离子是 CO_2 亲电加成的部位；接着就形成亲电加成中间物。中间物一经形成就被水解，产生两分子的3-磷酸甘油酸。



2. 3-磷酸甘油酸的还原

3-磷酸甘油酸在3-磷酸甘油酸激酶的催化下转变成 1,3-二磷酸甘油酸，然后在 3-磷酸甘油醛脱氢酶的催化下，由光反应产生的 NADPH 将 1,3-二磷酸甘油酸还原成3-磷酸甘油醛。这两步反应与糖异生作用的两步反应基本相同，其差别是还原剂的不同。

如果初始反应是由三分子的1,5-二磷酸核酮糖开始，那么至此则有六分子的3-磷酸甘油醛形成。

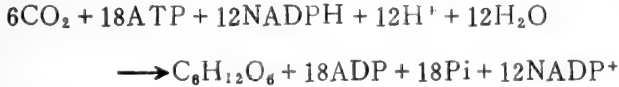
3. 1,5-二磷酸核酮糖的再生

一分子的3-磷酸甘油醛与一分子的磷酸二羟丙酮（由3-磷酸甘油醛异构化产生）在醛缩酶的催化下生成果糖-1,6-二磷酸。果糖-1,6-二磷酸经果糖二磷酸酶作用生成果糖-6-磷酸，后再与另一分子的3-磷酸甘油醛在转酮醇酶的催化下，产生一分子的5-磷酸木酮糖和一分子的4-磷酸赤藓糖。4-磷酸赤藓糖与另一分子的磷酸二羟丙酮（由3-磷酸甘油醛转变而成）在醛缩酶的作用下生成1,7-二磷酸景天庚酮糖，后者在庚酮糖二磷酸酶催化下除去C-1位上的磷酸基，生成7-磷酸景天庚酮糖。7-磷酸景天庚酮糖与另一分子的3-磷酸甘油醛在转酮醇酶的催化下，生成5-磷酸木酮糖和5-磷酸核糖。至此有两分子的5-磷酸木酮糖生成，它们可在表异构酶的作用下转变成5-磷酸核酮糖。5-磷酸核糖在异构酶的催化下也可转变成5-磷酸核酮糖。5-磷酸核酮糖在磷酸核酮糖激酶的催化下重新生成1,5-二磷酸核酮糖，后者又可以重新参与CO₂的固定反应。上述各步反应如图9—27所示，其中大多数反应与磷酸己糖支路的反应相同。由于戊糖可通过上述途径回生，故此循环又称为还原戊糖循环。

4. 葡萄糖的生成。

上述三分子的1,5-二磷酸核酮糖作为CO₂的受体同时参与三碳循环，结果是三分子的1,5-二磷酸核酮糖重新生成，并且还有一分子的3-磷酸甘油醛节余。如果有六分子的1,5-二磷酸核酮糖同时开始反应，便有两分子的3-磷酸甘油醛节余，其中一分子经异构化转变成磷酸二羟丙酮。于是一分子的3-磷酸甘油醛与一分子的磷酸二羟丙酮缩合，并沿与糖异生相同的反应生成果糖或葡萄糖。三碳循环本身的净结果是生成磷酸丙糖。

由三碳循环固定六分子的CO₂并使其还原，最终生成葡萄糖的总反应是：



所以，一分子葡萄糖的生成需要光反应提供18分子的ATP和12分子的NADPH。

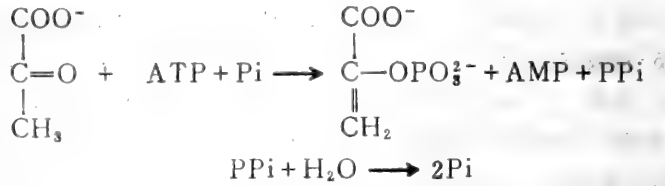
通过光合作用合成的己糖可以在植物体内进一步转变成淀粉、蔗糖、纤维素以及其他结构多糖。

5. 四碳双羧酸循环

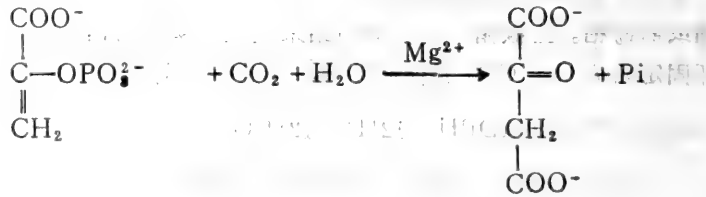
在六十年代，澳大利亚的两位生物化学家 Hatch 和 Slack 发现某些热带植物，例如甘蔗、玉米、高粱等高产作物，有一个转运CO₂的附属途径，为三碳循环提供高浓度的CO₂。他们用¹⁴CO₂证实，在这类植物的叶片中存在两种循环（或途径），这两种循环涉及紧密联系的两类细胞。一类是叶肉细胞（Mesophyll cells），与空气接触；另一类是维管束细胞（Bundle-Sheath cells），位于叶肉细胞的里侧。这两类细胞进行两种不同的固定CO₂的反应，叶肉细胞以磷酸烯醇式丙酮酸作为CO₂的受体，固定大气中的CO₂，形成草酰乙酸。草酰乙酸转变成苹果酸后进入到维管束细胞的叶绿体内，在叶绿体内脱羧释放CO₂，并转变成丙酮酸。丙酮酸进入叶肉细胞，并在叶肉细胞内重新转变成磷酸烯醇式丙酮酸，完成一次循环。由于CO₂固定后的最初产物草酰乙酸是一种四碳双羧酸，所以这个循环就叫做四碳双羧酸循环或四碳途径（也叫 Hatch-Slack 途径）（图9—28）。在维管束细胞的叶绿体中进行三碳循环，它利用四碳双羧酸循环提供的高浓度CO₂高效率地合成糖。具有这种功能的植物叫做四碳植物。缺乏四碳双羧酸循环的植物称为三碳植物。三碳循环在这两类

植物中都存在。

四碳植物为什么能进行四碳双羧酸循环呢？因为在这类植物的叶肉细胞的叶绿体内有两种特殊的酶。一种是丙酮酸-磷酸二激酶（Pyruvate-Phosphate dikinase），另一种是磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶。丙酮酸-磷酸二激酶能利用一分子的 ATP 使丙酮酸和无机磷酸分别磷酸化，生成磷酸烯醇式丙酮酸和焦磷酸。焦磷酸的水解可以推动这一反应向右进行。



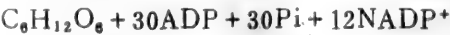
磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶催化 CO₂ 的固定反应。该酶在叶肉细胞的叶绿体内活性很高，并且对 CO₂ 有很高的亲和力。因此，该酶具有很强的固定 CO₂ 的能力，即使在热带空气中 CO₂ 浓度很稀的情况下，仍能高效地固定 CO₂。这里，叶肉细胞的叶绿体起着收集和浓缩空气中 CO₂ 的作用。



这个酶不存于动物细胞中，不能与磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶混淆。

在叶肉细胞中羧化生成的草酰乙酸也可通过转氨作用产生天冬氨酸，后者进入到维管束细胞后脱氨并脱羧，产生 CO₂，供三碳循环利用。

由于丙酮酸-磷酸二激酶催化反应的特殊性，所以当一分子 CO₂ 从叶肉细胞转运到维管束细胞中时需要消耗两个高能磷酸基。那么，在四碳植物中，通过四碳双羧酸循环和三碳循环共同运行合成一分子葡萄糖时所消耗的 ATP，比三碳植物只通过三碳循环合成一分子葡萄糖所消耗的 ATP 多。



在四碳植物中，维管束细胞叶绿体内 CO₂ 的高浓度是加快光合作用的速度所必需的。因为当光很充足时，CO₂ 的量就成了光合作用速度的限制因素。所以能量的额外消耗是有价值的。这也是热带作物高产的重要原因。

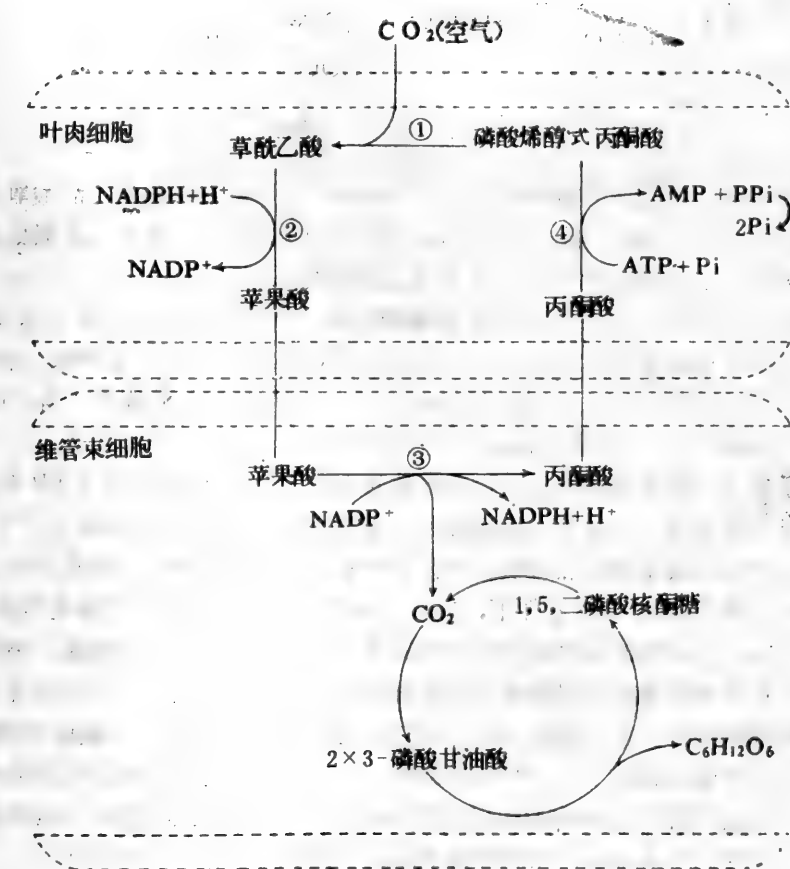


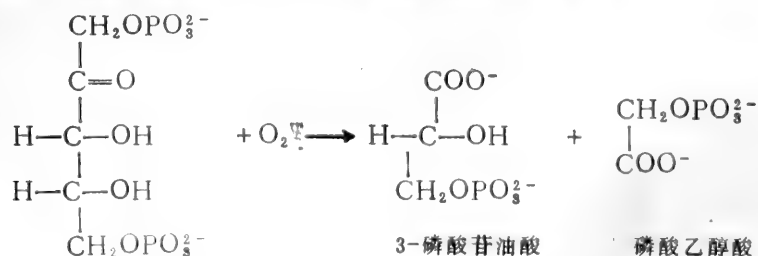
图 9—28 四碳双羧酸循环及其功能

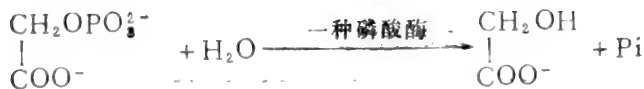
- ① 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶；② 连接 NADP⁺ 的苹果酸脱氢酶；
③ 苹果酸酶；④ 丙酮酸-磷酸二激酶。

五、光呼吸

在夜晚，在三碳植物和四碳植物的叶细胞线粒体中都能进行呼吸作用和磷酸化作用。通过仔细分析氧和二氧化碳的交换速度，表明三碳植物在光照下也存在消耗氧的呼吸作用。但是，这是一种与线粒体呼吸作用不同的过程，它不被氰化物抑制。这种在光照下消耗氧的过程叫做光呼吸（Photorespiration）。

在三碳植物中，光呼吸的主要底物是乙醇酸，它是由磷酸乙醇酸去磷酸后产生的，而磷酸乙醇酸是1,5-二磷酸核酮糖与 O₂ 作用（即氧合作用）的产物。





乙醇酸

乙醇酸后续代谢发生在过氧化物酶体 (Peroxisomes) 中。在那儿被乙醇酸氧化酶氧化产生乙醛酸和 H_2O_2 ，后者可被过氧化氢酶分解产生 H_2O 和 O_2 。乙醛酸可被氧化成草酸，草酸易分解产生 CO_2 。乙醛酸也可转变成甘氨酸和其他物质。

光呼吸的发生归因于 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶的特殊性质。这个酶不仅具有羧化酶的活性，而且也具有加氧酶 (Oxygenase) 的活性。 O_2 不仅与 CO_2 竞争酶的活性中心，而且可以取代 CO_2 而参与反应。究竟反应如何进行，取决于 CO_2 的浓度。当 CO_2 浓度较低时，呼吸作用加强；当 CO_2 浓度高时，光合作用加强。

光呼吸看来是一种浪费过程，它将有机碳转化成 CO_2 ，而不产生 ATP 和 NADH，这与线粒体呼吸作用相反。在缺乏四碳途径的三碳植物中，因光呼吸而减少了 CO_2 固定成糖的机会。但在具有四碳途径的热带植物中，光呼吸很弱，因为维管束细胞中的 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶处在高浓度的 CO_2 条件下，1,5-二磷酸核酮糖的氧合作用被竞争性地抑制。当温度升高时，1,5-二磷酸核酮糖羧化酶的加氧酶活性比羧化酶活性增高快，因此，四碳途径在高温下减少光呼吸就显得特别重要。四碳植物和三碳植物在地理上的分布现可以从分子水平上了解。四碳植物由于有上述优点，所以它们主要分布在热带；三碳植物因缺乏四碳途径，其只能在比较低的温度下 (大约低于 28°C) 有效地进行光合作用，所以它们主要分布在温带地区。有人正试图用光呼吸抑制剂抑制光呼吸作用以提高三碳植物 CO_2 固定效率，也有人企图用生化育种的方法筛选出光呼吸低的品种。但愿这种努力获得成功。

第十章 脂类代谢

脂类所包括的一大类化合物已在第二章介绍。本章主要介绍脂类的吸收、运转，以及在活体内的分解、合成和相互转变的过程。并进一步阐明这些转变的生理意义。

第一节 脂类化合物的吸收和运转

脂类化合物在动物体内的吸收由小肠完成。同位素实验指出：食物脂肪40%水解成甘油和脂肪酸，约10%以三酰甘油形式被吸收，其余则以部分水解产物如2-单酰甘油和二酰甘油被吸收，水溶性甘油离开肠而由门静脉吸收。

碳链在十个碳以下的脂肪酸首先以非酯化形式经门静脉吸收直接进入肝脏。长链脂肪酸（十四碳以上）不管是以自由形态喂入还是以三酰甘油形态喂入，几乎是定量地以再生三酰甘油的形式以乳糜微粒状出现在淋巴中。这些乳糜微粒直径为 $1\mu m$ ，为脂蛋白，主要含脂类，还含少量蛋白质。这些乳糜微粒经胸导管和其它辅助导管如颈静脉等进入血流中，输送到身体各部位，其中一部分经适当改造形成贮脂，一部分氧化分解提供能量，另一部分参与合成细胞膜及其它生物膜的各种成分。

甘油磷脂在小肠内被磷脂酶水解成甘油、脂肪酸、磷酸和一些含氮碱等而被吸收，也可以未水解形式被吸收。其主要途径也是由门静脉进入肝脏，或由淋巴进入血循环。

胆固醇及其酯也是从肠粘膜吸收。

一、影响脂类吸收的因素

影响脂类吸收的因素很多，如脂类的水溶性、脂类与蛋白质的相互作用、脂类形成微粒以及重新合成甘油三酰的酶的专一性等的差异，都会影响脂的不同吸收途径。在这些因素中，影响脂类穿过肠粘膜的因素最重要的是肠腔的去污剂。

当胆与肠道间完全阻塞时，胆汁不能流入肠腔，会造成严重的肝功能退化和胆瘻管形成，脂类吸收完全受阻。无胆色素的粪便，脂含量很高，并有很多脂肪酸钙盐。体内脂溶性维生素的吸收也大大降低。由于胆酸盐可与单酰甘油和其它脂溶性物质等形成混合微粒，这微粒可经肠粘膜表面的水层而移动，故胆酸盐可将脂类乳化，并载脂跨过肠粘膜屏障。虽然胆酸起载脂作用跨过肠粘膜，但胆酸并不进入淋巴循环，而是进入静脉血循环，被肝脏运回到十二指肠。经肠肝循环，胆酸的损失量不多，少量出现在外周血中，每天约有500mg由粪便排出。

影响脂类从肠吸收的第二个因素是肠粘膜的代谢活性。肠粘膜的酶把脂肪酸、一酰甘油、二酰甘油转变为三酰甘油。

肠粘膜对固醇类的吸收有选择性，特别对植物性固醇有选择性。主要的食物固醇中只有胆固醇（不是胆固醇酯），它易于跨过肠壁经由乳糜途径吸收。

二、血浆脂蛋白与脂的运输

由于大部分脂实际上都不溶于水，故这些物质在血浆中的运输是与专一性蛋白质结合而完成的。实际上，在血浆中没有哪一种脂不与蛋白质结合。这些脂蛋白运输系统的脂蛋白是由肠粘膜（20%）和肝脏（80%）所制造，这运输系统为组织提供脂类，主要是三酰甘油，用于氧化供能和贮存。

正常血浆在吸收完毕时，每升血含 500mg 总脂。其中约 120mg 为三酰甘油， 220 ± 20 mg 胆固醇及其酯。磷酸甘油酯类组分在血浆中约含 160mg/dl；磷脂酰胆碱的浓度比磷脂酰乙醇胺高。自由脂肪酸很少。

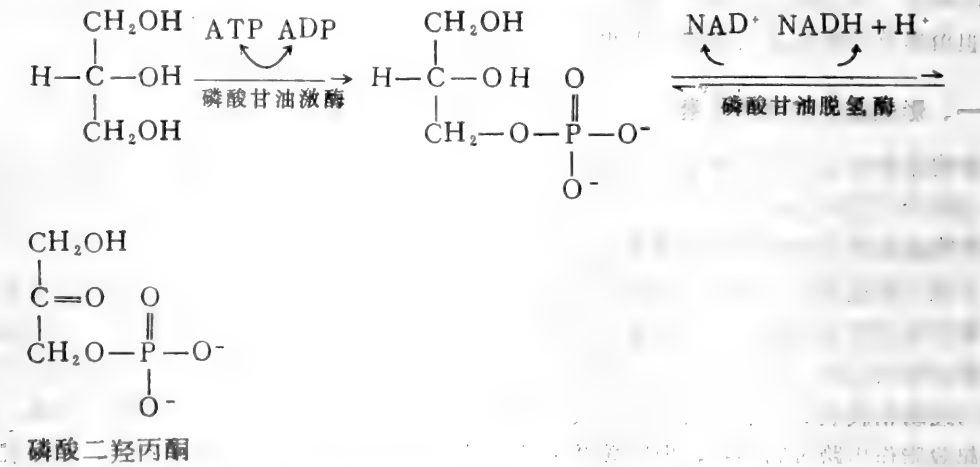
脂蛋白除乳糜微粒外，主要有极低密度脂蛋白、低密度脂蛋白、高密度脂蛋白和极高密度脂蛋白四种。它们的成分及一些性质见第二章表2—5

第二节 甘油三脂的分解代谢

进入细胞的甘油三酯的量是很有限的，在血浆中移动的脂蛋白脂肪酶可以使之水解，脂肪组织中的受激素活化的脂蛋白脂肪酶亦可使之水解。水解后形成的脂肪酸结合于血清清蛋白上，甘油则经3-磷酸甘油进入酵解途径。

一、甘油的分解代谢

甘油经下列途径和相应的酶催化，形成糖酵解中间物——磷酸二羟丙酮。反应如下，



生成的磷酸二羟丙酮，可经糖酵解途径继续分解氧化生成丙酮酸，进入三羧酸循环途径，彻底氧化，也可逆发酵途径，最后合成糖元。亦可重新转变为3-磷酸甘油，作为体内脂肪和磷脂等的合成原料。

二、脂肪酸的分解代谢

进入细胞中的脂肪酸，除了一部分重新合成脂肪作为贮脂外，大部分氧化供能以满足体

内能量之需。脂肪酸分解氧化的主要途径首先是通过 ATP、CoASH 等的作用，使脂肪酸转变为脂酰—CoA。然后通过脂酰基 β -碳原子上的氧化，使脂酰基以二碳化合物形式断裂

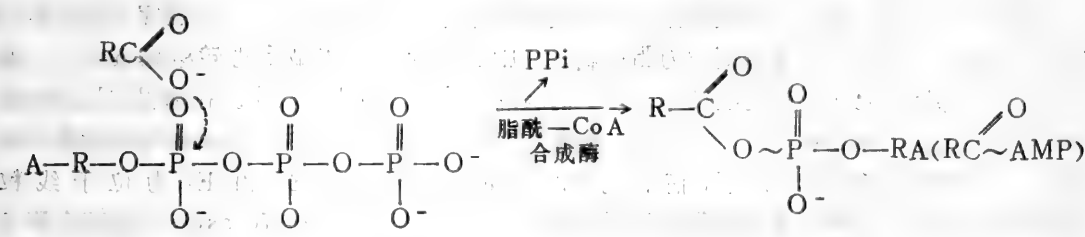
成 $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\sim\text{CoA}$ 。因此这个氧化途径称为脂肪酸分解的 β -氧化途径。

(一)脂肪酸分解的 β -氧化途径

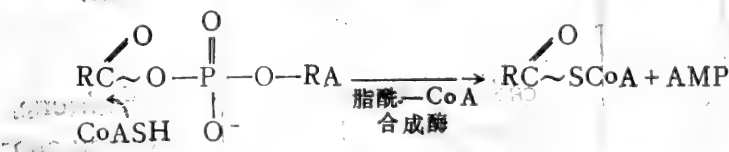
按 β -氧化途径降解饱和脂肪酸需经六个步骤。

1. 脂肪酸的活化

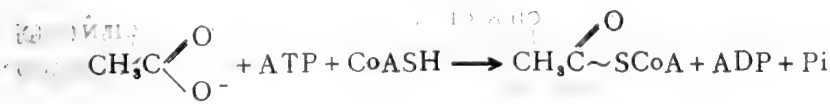
活化过程实际上就是把脂肪酸转变为脂酰—CoA。脂肪酸在 ATP 供能以及 CoASH 参与下，由脂酰—CoA 合成酶催化，即可完成反应。其反应分两步进行。首先是脂肪酸的羧基氧亲核攻击 ATP 的 α -磷原子，形成脂酰~AMP。



然后，再由 CoASH 上的巯基硫原子代替磷酸基团，亲核攻击脂酰基的羧基碳，形成脂酰—CoA。RC~AMP 的高能混合酸酐键转变为高能硫酯键。



已经知道有好几种脂酰—CoA 合成酶。其名称是按其催化最快的脂肪酸链的长度而定。如乙酰—CoA 的合成酶，对乙酰—CoA 合成特别快，但它亦能催化丙酸和丙烯酸形成相应 CoA 衍生物。该酶需 Mg^{++} 、 Ni^{++} 和 K，广泛分布于各生物体中。还有一种乙酰—CoA 合成酶，在反应时不生成 AMP 而生成 ADP，它也能催化丙酸，并较慢地催化丁酸形成相应 CoA 衍生物。

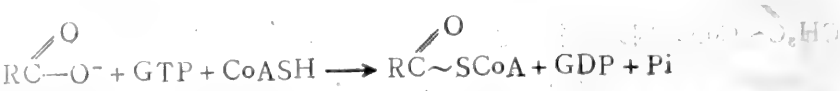


第二种酰基—CoA 合成酶催化 C_4-C_{12} 脂酰—CoA 的合成，称为辛酰—CoA 合成酶，它在动、植物中都存在，并需要 Mg^{++} 。

第三种酰基—CoA 合成酶，催化 $\text{C}_{10}-\text{C}_{18}$ 脂酰—CoA 的合成，称为十二脂酰—CoA 合成酶。存在于动物肝脏、酵母和其它细菌中。

以上脂酰—CoA 合成酶多存在于细胞内质网和线粒体外膜。在线粒体基质中还含有一

种脂酰—CoA 合成酶，它能利用 GTP 来代替 ATP，它只能活化长链脂肪酸，而且生成的产物不是 GMP 而是 GDP。



除了以上所述的脂酰—CoA 合成酶催化方式来活化脂肪酸的主要途径外，也可通过辅酶 A—转移酶（Thiophorases）催化，把琥珀酰—CoA 的 CoAS—基团转移到一些短链脂肪酸上合成短链脂酰—CoA。这种活化方式，在肝外组织形成乙酰乙酰 CoA 时显得最为重要。

2. 脂酰—CoA 向线粒体基质转移

脂肪酸氧化酶系都存在于线粒体中。在线粒体外合成的脂酰—CoA，不能穿过线粒体内膜进入线粒体基质中。肉毒碱则作为脂酰载体，脂酰—CoA 在 毒碱脂酰转移酶催化下，形成脂酰—肉毒碱，它可以穿过线粒体内膜，把脂酰基带进线粒体基质中。在那里，又在线粒体的肉毒碱脂酰转移酶催化下，重新形成脂酰—CoA，并释放肉毒碱。肉毒碱运载脂酰基的部位以及这些酯交换反应的进行情况示如图 10-1。图中的 E₂ 和 E₃ 为位于线粒体内膜外侧和内侧的两个肉毒碱脂酰基转移酶（carnitine acyltransferase）。这两个酶是

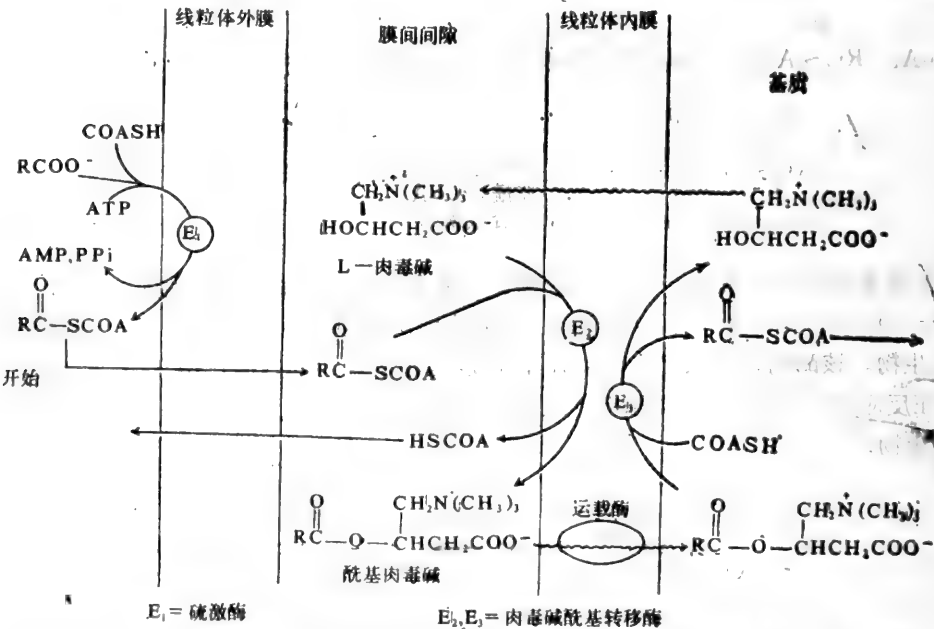


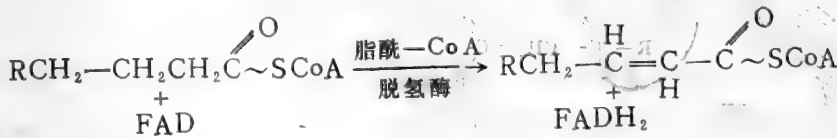
图10-1 在肉毒碱酰基转移酶催化下肉毒碱载脂并转移脂酰基的过程

抗原性不同，同工酶。前者主要催化脂酰—CoA 转化为脂酰肉毒碱，把 CoASH 释放于膜外，而后者则催化膜内的脂酰—肉毒碱和膜内的 CoASH 重新形成脂酰—CoA 并释放肉毒碱。然后肉毒碱自动透过线粒体内膜，继续执行其载脂基的任务。脂酰—CoA 可在

线粒体基质中继续氧化降解。

3. 脂酰—CoA 的 α — β 脱氢反应

在脂酰—CoA 脱氢酶的催化下，在线粒体基质中重新形成的脂酰—CoA，在 α , β 一位的氢被脱去，而形成 $\Delta^2,^3$ —反烯脂酰—CoA。

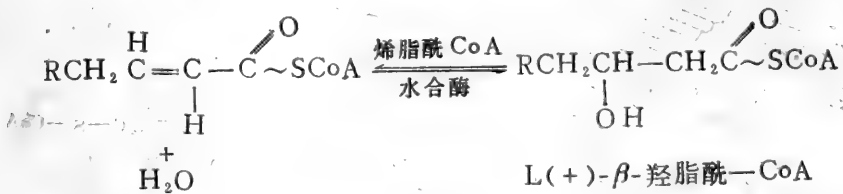


在线粒体基质中至少有三种脂酰—CoA 脱氢酶，即丁酰—CoA 脱氢酶、辛酰—CoA 脱氢酶和十六酰—CoA 脱氢酶等，它们能催化短链、中等长链和长链脂酰—CoA 迅速脱氢。这些脂酰—CoA 脱氢酶都是含 FAD 的黄素蛋白，它们接受电子后，旋即把电子传给电子传递黄素蛋白 (electron-transferring flavoprotein, ETF)，再直接向 Cytb 传递。

牛肝或猪肝中分离的脂酰—CoA 脱氢酶，能催化长链脂酰—CoA 脱氢。它是一个四聚体蛋白， $M \cdot W = 40,000$ ，每个亚基结合一个 FAD。

4. $\Delta^2,^3$ —反—烯脂酰—CoA 的水合反应

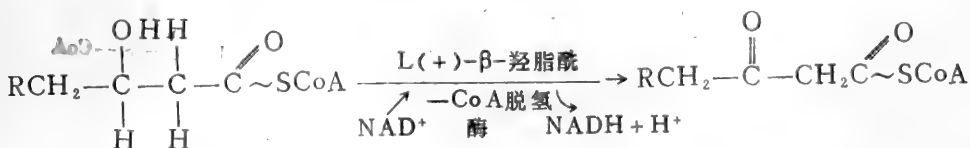
在烯脂酰—CoA 水合酶的催化下， $\Delta^2,^3$ —反—烯脂酰—CoA 起水合反应生成 L(+)- β -羟脂酰—CoA。该酶亦能催化 $\Delta^2,^3$ —顺—烯脂酰—CoA 起水合反应，但产物为 D(-)- β -羟脂酰—CoA。



脂酰—CoA。两种烯脂酰—CoA 水合酶中有一种在以巴豆酰—CoA 为底物时活性最高，称为巴豆酰或丁烯酰—CoA 水合酶，另一种则更易催化中长和长链脂酰—CoA 的水合作用。

5. β -羟脂酰—CoA 的脱氢反应

在 L(+)- β -羟脂酰—CoA 脱氢酶 (E.C.1.1.1.35) 催化下，L(+)- β -羟脂酰—CoA 脱氢氧化，形成 β -酮脂酰—CoA。该酶专一性很强，不能作用于 D-型底物。但可作用于不同长短链的 L-型底物。



6. β -酮脂酰—CoA 的硫解作用

在硫解酶或脂酰—CoA: 乙酰—CoA—脂酰基转移酶 (E.C.2.3.1.16) 催化下， β -酮脂酰—CoA 与 CoASH 起硫醇解反应生成乙酰—CoA，和一个脂酰—CoA (比原来的酮脂酰

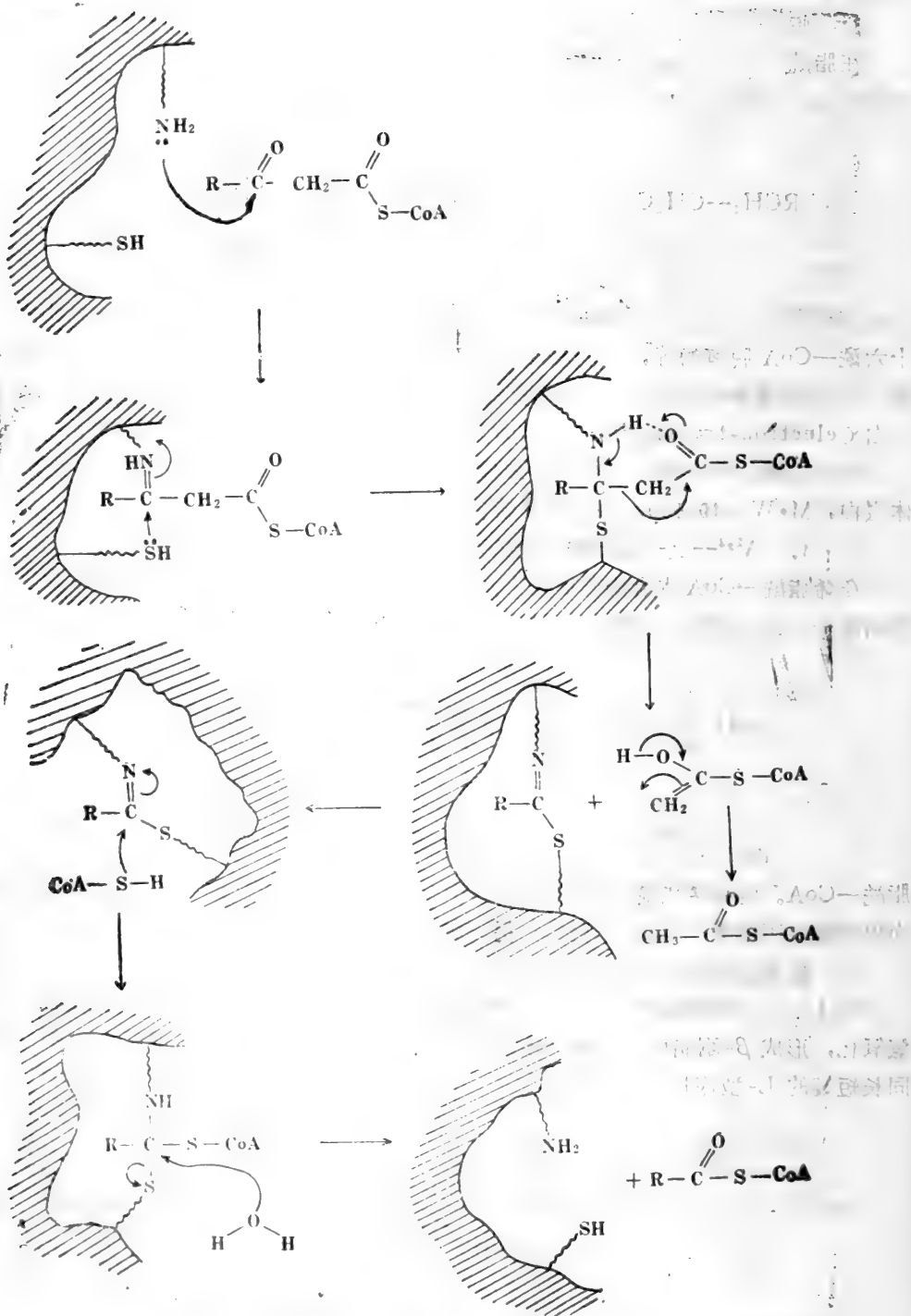


图10-2 硫解酶催化 β -酮脂酰的硫醇解反应机制

—CoA 少两个碳原子)。反应实质是CoASH 的—SH 硫原子对 β-酮基碳进行亲核攻击。



该酶活性中心有—SH 和 —NH₂，反应分两步进行：首先是酶的 Lys-ε-NH₂ 亲核攻击 β-酮基碳，亲核加成形成 Schiff's 碱。酶活性部位的—SH 再亲核攻击 Schiff's 碱的甲川基碳原子，从而排斥 CH₃C~SCoA 分子，然后由 CoASH 上的—SH 基代替酶的—SH 接受比原来少两个碳原子的脂酰基形成脂酰—CoA。如图10-2。

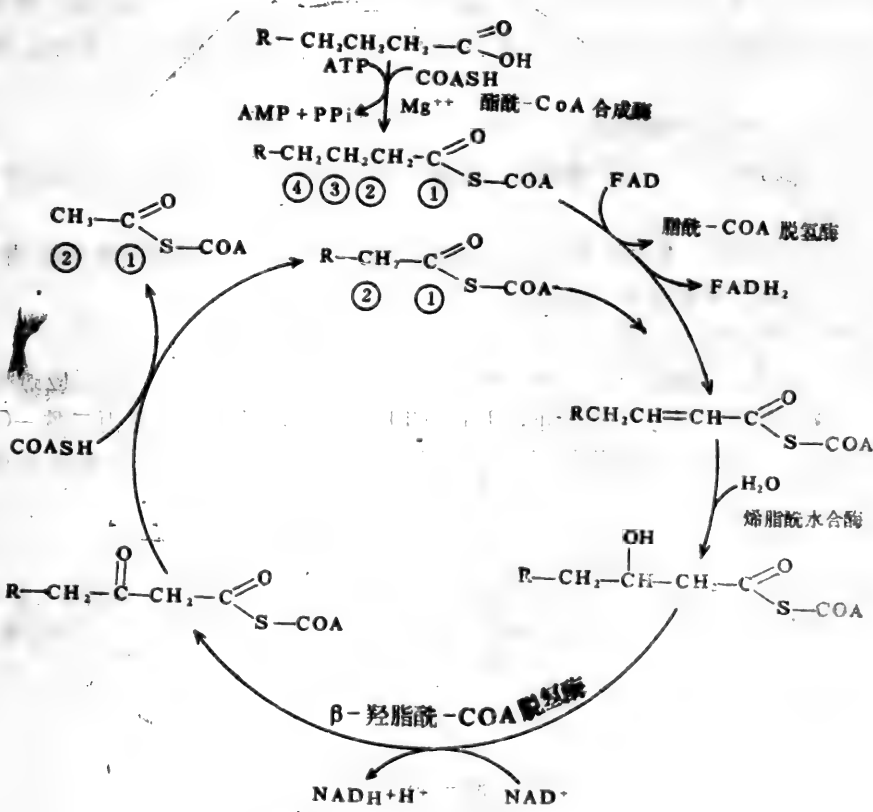


图10-3 脂肪酸 β-氧化途径

脂肪酸 β-氧化的一轮反应可总结如图10-3。每一轮反应生成一个 CH₃C~SCoA、一个 FADH₂ 和一个 NADH。CH₃C~SCoA 通过三羧酸循环彻底氧化，最后可生成12个 ATP。

FADH₂ 和 NADH 经呼吸链氧化各产生 2 个 ATP 和 3 个 ATP。因此 β -氧化脂肪酸，一轮反应共可产生 17 个 ATP。一个硬脂酸经 β -氧化共可产生 9 个 $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\sim\text{SCoA}$ 、8 个 FADH₂ 和 8 个 NADH。共产生 $9 \times 12 + 8 \times 5 = 148$ 个 ATP。扣除第一步活化用去一个 ATP，可净获 147 个 ATP。

(二) 不饱和脂肪酸的分解代谢

不饱和脂肪酸的分解代谢途径与饱和脂肪酸的 β -氧化途径相似。由于它比相应的饱和脂肪酸多一个双键，所以在氧化过程中还需要有一个酶把脂肪酸分子中原有的顺式双键结构催化转变为反式结构以适于烯脂酰—CoA 水合酶的要求。如果不饱和脂肪酸带两个双键则还要另加一个酶把 D(-)- β -羟脂酰—CoA 催化转变成 L(+)- β -羟脂酰—CoA，以适应 β -羟脂酰脱氢酶的要求。前一种酶称为 Δ^3 -顺， Δ^2 -反-烯脂酰—CoA 异构酶，它催化 Δ^3 -顺烯脂酰—CoA 转变为 Δ^2 -反烯脂酰—CoA。后一种酶称为 β -羟脂酰—CoA 差向异构酶。

兹以十八碳二烯酸为例说明以上两个酶的作用，并表示出不饱和脂肪酸的氧化途径。

十八碳二烯脂酰—CoA 即 $\Delta^9,10$ -顺— $\Delta^{12,13}$ -顺—十八碳二烯脂酰—CoA。其氧化过程如图 10-4。

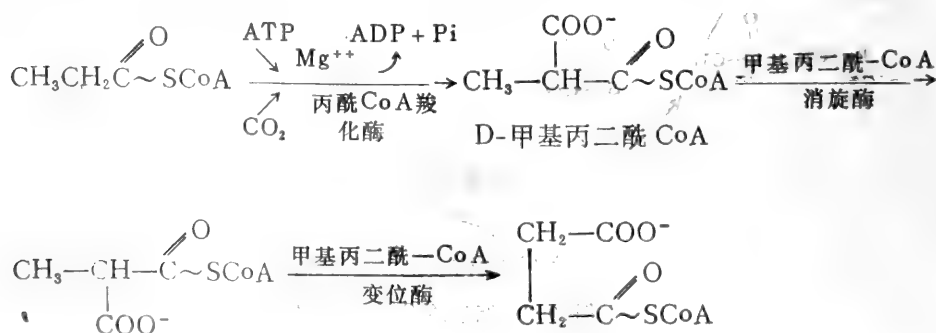
(三) 奇数脂肪酸的分解代谢

生物界的脂肪酸大多为偶数碳原子，但也有部分奇数碳脂肪酸存在。它们按 β -氧化除

产生 $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\sim\text{SCoA}$ 外，最后还剩下一个 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\sim\text{SCoA}$ 。丙酰 CoA 不能再按 β -氧化继续氧化，它的继续降解有两个途径。

1. 转变成琥珀酰—CoA

丙酰—CoA 转变成琥珀酰—CoA，然后进入三羧循环继续氧化。其反应过程首先是丙酰—CoA 在含生物素的羧化酶催化下，并在 ATP 参与下，羧化成甲基丙二酰—CoA，然后再在甲基丙二酰—CoA 变位酶催化下，转变为琥珀酰—CoA。这个变位酶的作用是其辅酶



—维生素 B₁₂ 辅酶，从一个碳原子上除去一个氢原子，并直接转移到其邻位碳原子上，同时发生第二个取代基的交换。这个反应在平衡时，琥珀酰 CoA: 甲基丙二酰—CoA = 20:1。缺 B₁₂ 辅酶时，大量丙酸和甲基丙二酸将会由尿排去。

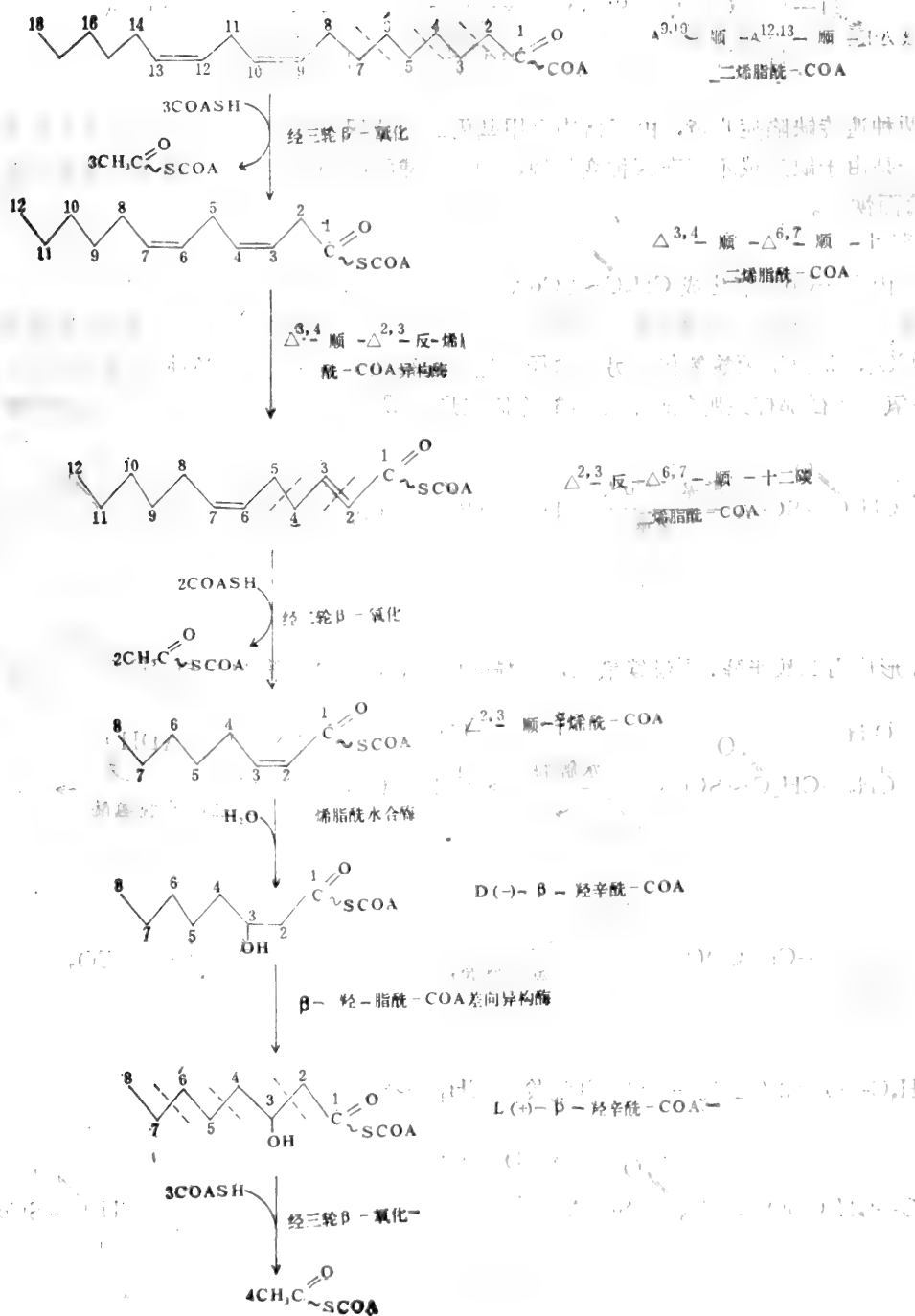
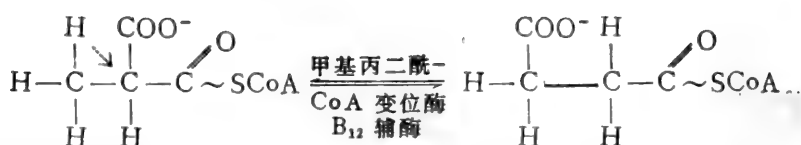


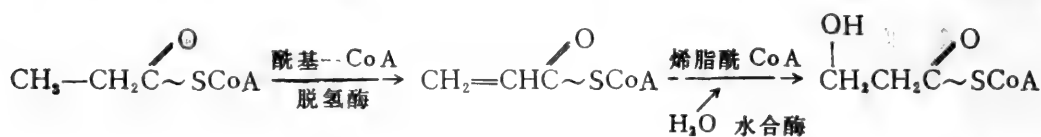
图10-4 不饱和脂肪酸的氧化过程



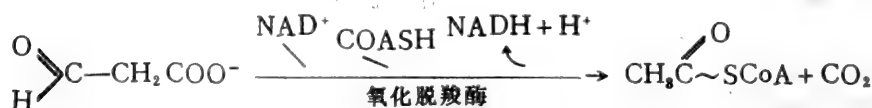
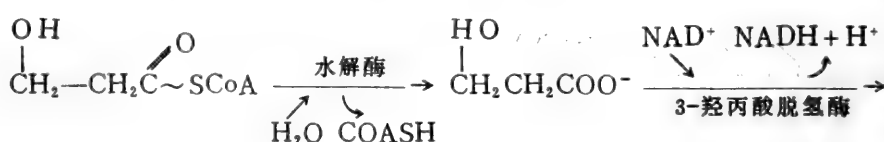
有两种遗传缺陷症儿童，由于血中含甲基丙二酸或尿中含甲基丙二酸而不能生长或智力减退。一是由于缺乏或不存在这种变位酶，加 B_{12} 辅酶时仍不能恢复，而另一种则可加大量 B_{12} 辅酶而恢复。

2. 丙酰—CoA 氧化成 $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{SCoA}$

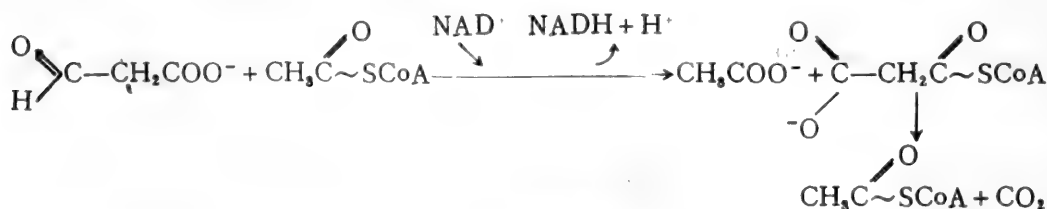
缺乏丙酰—CoA 羧化酶的遗传病患者，有丙酸血和丙酸尿症，但他们仍能把部分丙酸氧化成 CO_2 ，是由于丙酸氧化有另一途径。这一途径较为复杂，有多种酶参与反应。首先是象 β -氧化途径那样经脱氢酶、水合酶等催化形成 β -羟基丙酰—CoA，再经3-羟丙酸脱氢



酶催化，形成丙二酸半醛，再继续氧化成乙酰—CoA。丙二酸半醛也可与 $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{SCoA}$ 反应



生成 $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{O}^-$ 和丙二酰—CoA，再脱羧成 $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{SCoA}$ 。



(四) 脂肪酸的 ω 氧化途径

生物体内一些中长链（如癸酸、十二碳酸）以及少量长链脂肪酸，能首先从烃基端 ω

碳氧化，生成 α, ω 二羧酸，称为 ω 氧化。生成的二羧酸 再从两端进行 β -氧化。 ω -氧化的第一步是由需 NADPH、 O_2 和细胞色素 P450 (CytP450) 的单加氧酶催化。该酶已初步分离成三个酶组分：第一个是需 NADPH 的黄素氧化还原酶，第二个 是一种非正铁血红素蛋白，第三种是细胞色素 P450。这种 酶系是由动物肝内质网组份中分离获得，反应可表示如图10-5。

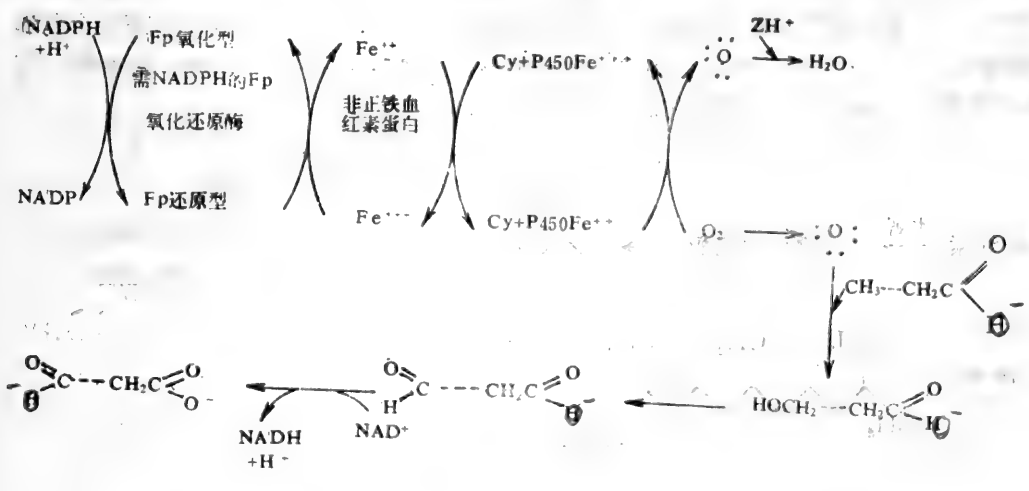


图10-5 动物的脂肪酸 ω -氧化途径

一些假单胞杆菌属的微生物中，也观察到 ω 氧化途径。它包含 一个需 NADH 的还原酶，一个羟化酶，一个小的红色非血红素铁硫蛋白，称为 红铁氧还 蛋白 (Rubredoxin)。反应如图10-6。

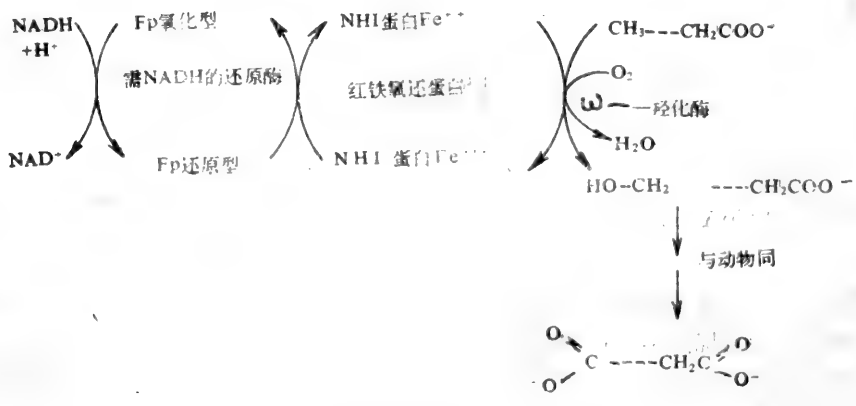


图10-6 细菌的脂肪酸 ω -氧化途径

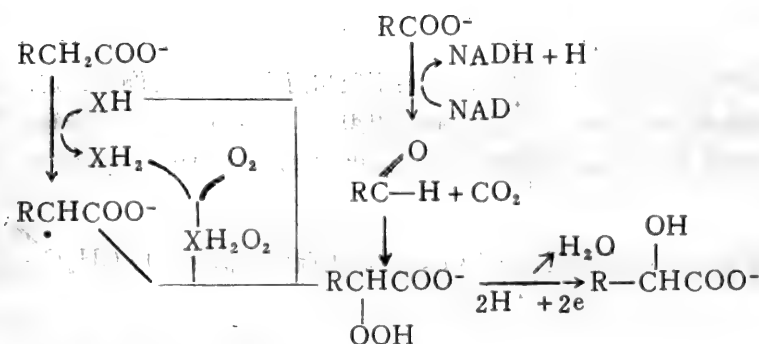
ω -氧化酶系无论从理论上或实际上已日益受到重视。溢出 海洋中的大量石油中的直链 烃，经海面浮游细菌中的脂肪酸 ω -氧化酶系的氧化，可形成脂肪酸。其氧化速率可高达0.5 克/天/平方米，这对清除海面石油污染无疑会起重要作用。现已从油浸土壤中分离出许多细

1990 1991 1992 1993 1994 1995 1996 1997 1998 1999 2000 2001 2002 2003 2004 2005 2006 2007 2008 2009 2010 2011 2012 2013 2014 2015 2016 2017 2018 2019 2020 2021 2022 2023 2024 2025 2026 2027 2028 2029 2030 2031 2032 2033 2034 2035 2036 2037 2038 2039 2040 2041 2042 2043 2044 2045 2046 2047 2048 2049 2050 2051 2052 2053 2054 2055 2056 2057 2058 2059 2060 2061 2062 2063 2064 2065 2066 2067 2068 2069 2070 2071 2072 2073 2074 2075 2076 2077 2078 2079 2080 2081 2082 2083 2084 2085 2086 2087 2088 2089 2090 2091 2092 2093 2094 2095 2096 2097 2098 2099 2100 2101 2102 2103 2104 2105 2106 2107 2108 2109 2110 2111 2112 2113 2114 2115 2116 2117 2118 2119 2120 2121 2122 2123 2124 2125 2126 2127 2128 2129 2130 2131 2132 2133 2134 2135 2136 2137 2138 2139 2140 2141 2142 2143 2144 2145 2146 2147 2148 2149 2150 2151 2152 2153 2154 2155 2156 2157 2158 2159 2160 2161 2162 2163 2164 2165 2166 2167 2168 2169 2170 2171 2172 2173 2174 2175 2176 2177 2178 2179 2180 2181 2182 2183 2184 2185 2186 2187 2188 2189 2190 2191 2192 2193 2194 2195 2196 2197 2198 2199 2200 2201 2202 2203 2204 2205 2206 2207 2208 2209 2210 2211 2212 2213 2214 2215 2216 2217 2218 2219 2220 2221 2222 2223 2224 2225 2226 2227 2228 2229 2230 2231 2232 2233 2234 2235 2236 2237 2238 2239 2240 2241 2242 2243 2244 2245 2246 2247 2248 2249 2250 2251 2252 2253 2254 2255 2256 2257 2258 2259 2260 2261 2262 2263 2264 2265 2266 2267 2268 2269 2270 2271 2272 2273 2274 2275 2276 2277 2278 2279 2280 2281 2282 2283 2284 2285 2286 2287 2288 2289 2290 2291 2292 2293 2294 2295 2296 2297 2298 2299 2300 2301 2302 2303 2304 2305 2306 2307 2308 2309 2310 2311 2312 2313 2314 2315 2316 2317 2318 2319 2320 2321 2322 2323 2324 2325 2326 2327 2328 2329 2330 2331 2332 2333 2334 2335 2336 2337 2338 2339 2340 2341 2342 2343 2344 2345 2346 2347 2348 2349 2350 2351 2352 2353 2354 2355 2356 2357 2358 2359 2360 2361 2362 2363 2364 2365 2366 2367 2368 2369 2370 2371 2372 2373 2374 2375 2376 2377 2378 2379 2380 2381 2382 2383 2384 2385 2386 2387 2388 2389 2390 2391 2392 2393 2394 2395 2396 2397 2398 2399 2400 2401 2402 2403 2404 2405 2406 2407 2408 2409 2410 2411 2412 2413 2414 2415 2416 2417 2418 2419 2420 2421 2422 2423 2424 2425 2426 2427 2428 2429 2430 2431 2432 2433 2434 2435 2436 2437 2438 2439 2440 2441 2442 2443 2444 2445 2446 2447 2448 2449 2450 2451 2452 2453 2454 2455 2456 2457 2458 2459 2460 2461 2462 2463 2464 2465 2466 2467 2468 2469 2470 2471 2472 2473 2474 2475 2476 2477 2478 2479 2480 2481 2482 2483 2484 2485 2486 2487 2488 2489 2490 2491 2492 2493 2494 2495 2496 2497 2498 2499 2500 2501 2502 2503 2504 2505 2506 2507 2508 2509 2510 2511 2512 2513 2514 2515 2516 2517 2518 2519 2520 2521 2522 2523 2524 2525 2526 2527 2528 2529 2530 2531 2532 2533 2534 2535 2536 2537 2538 2539 2540 2541 2542 2543 2544 2545 2546 2547 2548 2549 2550 2551 2552 2553 2554 2555 2556 2557 2558 2559 2560 2561 2562 2563 2564 2565 2566 2567 2568 2569 2570 2571 2572 2573 2574 2575 2576 2577 2578 2579 2580 2581 2582 2583 2584 2585 2586 2587 2588 2589 2590 2591 2592 2593 2594 2595 2596 2597 2598 2599 2600 2601 2602 2603 2604 2605 2606 2607 2608 2609 2610 2611 2612 2613 2614 2615 2616 2617 2618 2619 2620 2621 2622 2623 2624 2625 2626 2627 2628 2629 2630 2631 2632 2633 2634 2635 2636 2637 2638 2639 2640 2641 2642 2643 2644 2645 2646 2647 2648 2649 2650 2651 2652 2653 2654 2655 2656 2657 2658 2659 2660 2661 2662 2663 2664 2665 2666 2667 2668 2669 2670 2671 2672 2673 2674 2675 2676 2677 2678 2679 2680 2681 2682 2683 2684 2685 2686 2687 2688 2689 2690 2691 2692 2693 2694 2695 2696 2697 2698 2699 2700 2701 2702 2703 2704 2705 2706 2707 2708 2709 2710 2711 2712 2713 2714 2715 2716 2717 2718 2719 2720 2721 2722 2723 2724 2725 2726 2727 2728 2729 2730 2731 2732 2733 2734 2735 2736 2737 2738 2739 2740 2741 2742 2743 2744 2745 2746 2747 2748 2749 2750 2751 2752 2753 2754 2755 2756 2757 2758 2759 2760 2761 2762 2763 2764 2765 2766 2767 2768 2769 2770 2771 2772 2773 2774 2775 2776 2777 2778 2779 2780 2781 2782 2783 2784 2785 2786 2787 2788 2789 2790 2791 2792 2793 2794 2795 2796 2797 2798 2799 2800 2801 2802 2803 2804 2805 2806 2807 2808

一个碳

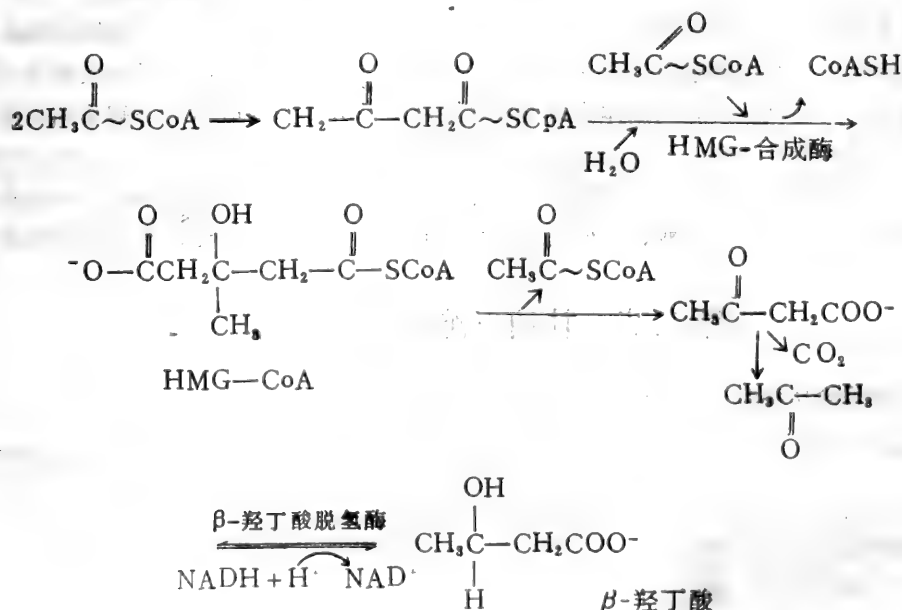
成 α -羟

方酸，它



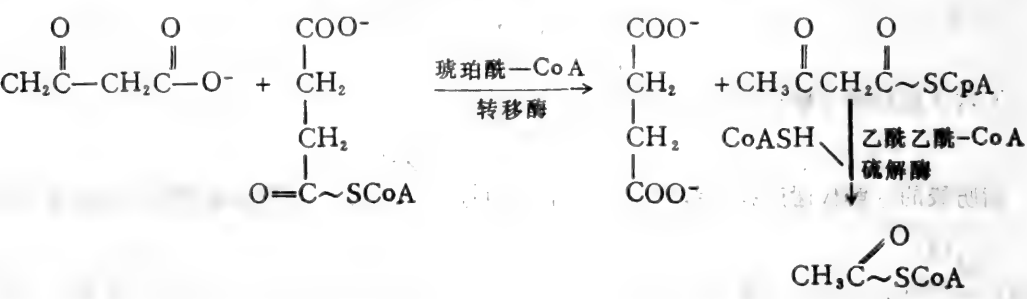
(六) 脂肪酸分解代谢中的酮体代谢

脂肪酸的分解代谢产物最终大部分都生成 $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\sim\text{SCoA}$ 。在肝外组织如心肌、骨骼肌中， $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\sim\text{SCoA}$ 可进入三羧循环彻底氧化成 H_2O 和 CO_2 。但在肝脏中 $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\sim\text{SCoA}$ 又可缩合成乙酰乙酰—CoA，它又可再与一分子 $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\sim\text{SCoA}$ 缩合成 3-羟-3-甲基戊二酰—CoA (HMG—CoA)。HMG—CoA 又可裂解成为 $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\sim\text{SCoA}$ 和乙酰乙酸。乙酰乙酸在肝 β -羟丁酸脱氢酶催化下生成 β -羟丁酸。乙酰乙酸也可脱羧形成 $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{—CH}_3$ 。反应过程可示如下式：

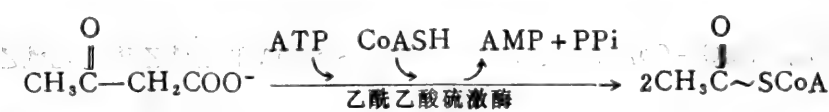


肝脏中生成的 $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{COO}^-$ 、 β -羟丁酸和丙酮等通称为酮体。这是肝脏正常的脂代谢产物。但肝脏缺乏降解酮体的酶，而肝外组织则能迅速使酮体氧化降解，故酮体须运往肝外组织。在肝外组织中， β -羟丁酸脱氢酶催化 β -羟丁酸转变为乙酰乙酸，再在琥珀酰—

—CoA 转移酶催化下形成乙酰乙酰—CoA，最后由硫解酶催化形成 $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{SCoA}$ 。



乙酰乙酸也可在乙酰乙酸硫激酶催化下直接生成 $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{SCoA}$ 。



丙酮则经丙二醇再氧化成 $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{COO}^-$ 、 $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{SCoA}$ 进入三羧酸循环。

在正常情况下，肝外组织可迅速氧化酮体，故血液中酮体含量很少（1mg/100ml血）。但当机体糖代谢失常（如糖尿病患者），糖利用受阻，或长期饥饿时，则机体大量动用脂肪供能，肝脂肪被大量氧化，肝内酮体生成速度就会超过肝外组织对酮体的分解和利用能力。这时血中酮体浓度就会升高，出现酮血症；尿中也会出现酮体，这称为酮尿症。当血中酮体浓度接近70mg/100ml 血时，肝外组织氧化酮体潜力已尽，如再继续增加酮体，则血和尿中酮体急剧增加，特别是 β -羟丁酸、乙酰乙酸的酸性较强，会引起酸中毒，严重可导致死亡。

第三节 甘油三酯的合成代谢

一、脂肪酸的从头合成

哺乳动物能合成机体所需的大部分 脂肪酸。饱和脂肪酸和常见的单不饱和 脂肪酸可迅速、大量地由 $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{SCoA}$ 合成。因此糖类以及一些氨基酸都可通过转变为 $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{SCoA}$ 而成为体内合成脂肪酸的原料。

饱和脂肪酸的合成，在所有有机体中均可进行。在哺乳动物体中它主要是在脂肪组织、乳腺和肝中进行。与脂肪酸的氧化不同，它不是在线粒体中进行，而主要的脂肪形成部位是在胞液中。脂肪酸的合成需要 NADPH、酸性碳酸盐和 Mn^{++} ，这些物质在脂肪酸氧化时是不需要的，脂肪酸的从头合成主要是合成软脂酸，这是脂肪酸合成的主要途径。这个合成反应主要由软脂酸合成酶催化，软脂酸是终产物，是哺乳动物、微生物中所有其它饱和及单不饱和脂肪酸的原料。

不同有机体中软脂酸合成酶的结构不同。在大肠杆菌和植物中，合成酶是一个多酶复合体，能解离成七个不同的酶，每个酶催化总合成软脂酸反应中的一个步骤。酵母、鸟类和哺乳类的肝脏和乳腺中的合成酶则相反，它是一个多功能酶，含 α 和 β 两个亚基，它们一起来催化软脂酸合成的每一步骤。

合成酶合成软脂酸时，主要是先通过 Claisen 缩合反应。为了使缩合反应的平衡向缩

合方向进行，生物体首先把 $CH_3C(=O)SCoA$ 羧化成丙二酰-CoA 然后在缩合时脱羧，而使反应平衡趋向缩合方向。因此在 $CH_3C(=O)SCoA$ 缩合反应以前，首先必需使之羧化。

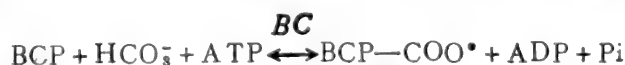
(一) 乙酰-CoA 的羧化

乙酰-CoA 羧化成丙二酰-CoA 的反应为：



这个反应由含生物素的乙酰-CoA 羧化酶催化。在大肠杆菌和植物中的羧化酶也是一个多酶复合体。可解离成三个组分：①生物素载体蛋白 (BCP)， $M \cdot W = 45,000$ ，含有两个亚基，每个亚基含一个生物素并与蛋白质的某 $Lys-e-NH_2$ 共价连结。②生物素羧化酶 (BC)， $M \cdot W = 98,000$ 。它也是一个含两个亚基的酶。③转羧酶 (TC)， $M \cdot W = 130,000$ 。

这个酶催化 $CH_3C(=O)SCoA$ 的羧化分两步进行。第一步是 BCP 在 ATP 供能情况下羧化成羧化 BCP。



BCP-COO⁻ 的结构见第五章羧化生物素酶。第二步是由转羧酶把 BCP-COO⁻ 的 -COO⁻

转移到 $CH_3C(=O)SCoA$ 的 α -碳上。



在动物和酵母中的乙酰—CoA 羧化酶与大肠杆菌中的不同，是一个多功能酶。BCP 羧化酶和转羧酶活性存在于单一的活性生物素肽链上，其 $M \cdot W = 220,000$ ，一个活性羧化酶至少存在两条这样的链。

肝脏和脂肪组织的乙酰—CoA 羧化酶活性，需要有柠檬酸和异柠檬酸的存在。非活性形式的酶由400,000—500,000道尔顿的原体构成，原体含有四个亚基。非活性原体被柠檬酸或异柠檬酸激活后聚合成5,000万至10,000万道尔顿的丝状形式。在形成羧化生物素后，如柠檬酸和异柠檬酸不存在，酶即解聚。

由于丙二酰—CoA 除用于合成软脂酸外，没有它代谢用处，所以通过调节羧化酶以调节脂肪酸的合成，不会干扰其它代谢途径。

在三羧酸循环中有关的柠檬酸和异柠檬酸作为活化乙酰—CoA 羧化酶的调节因子，来催化哺乳类脂肪酸合成的限速步骤。很明显，这是该酶的一个修饰剂，来调节该反应的 V_{max} ，而不是 K_m 。已注意到有过量的柠檬酸从线粒体自由地进入细胞质中，对该酶活性进行调节。

(2) 丙二酰—CoA 和乙酰—CoA 缩合形成软脂酸

丙二酰—CoA 和乙酰—CoA 合成软脂酸是一个缩合过程，要完成这循环的缩合过程需经许多步骤，需要一个多酶复合体，或一个多功能酶，这随不同有机体而异，已如上述。由于这缩合反应不管在那个有机体中，都是由软脂酸合成酶催化的七步反应构成，而大肠杆菌中的这个多酶复合体已经纯化而且深入进行过研究。所以首先介绍这个多酶复合体。

1. 软脂酸合成酶多酶复合体的构成

多酶复合体由七个成分构成。其中心成分称为酰基载体蛋白(ACP)，分子量较小。大肠杆菌的 ACP 是由77个氨基酸结合而成的肽。其36位丝氨酸与4'-磷酸泛酰巯基乙胺的磷酸基团以酯键结合，其结构见第六章。从其结构看，它有一个带—SH 的柔性长链，所以 ACP 又常写成 $ACP \sim SH$ 。由于它有这个—SH，故它可从各种酰基—SCoA 接受酰基而形成

$ACP \sim S-C(=O)-R$ ，并释放出 $CoASH$ 。同时它又能把酰基给予其它—SH，而自己又重新恢复成 $ACP \sim SH$ 。另外，由于它是一个长的柔性链，故它可以把酰基从一个地方传递到另一个地方，以适应多酶复合体中各种酶的需要。

$ACP \sim SH$ 是多酶复合体的中心，其它六个酶回绕它顺次排列于其周围，如图10—7。

2. 软脂酸合成酶多酶复合体的酶促反应

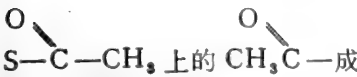
①首先由 $ACP \sim SH$ 将长臂伸入转酰基酶—1，该酶含有一个 $Ser-OH$ ，可先从

$CH_3-C(=O)-SCoA$ 或脂酰— $S \sim ACP$ 接受一个酰基，形成 $CH_3-C(=O)-O-酶-1$ 或 $RC(=O)-O-酶-1$ 。当 $ACP \sim SH$ 伸向它时，酶-1上的 $CH_3-C(=O)-$ 或 $-RC(=O)-$ 即转移到 $ACP \sim SH$ 上形成

$ACP \sim S-C(=O)-CH_3$ ，然后 $ACP \sim S-C(=O)-CH_3$ 靠 ACP 的长臂摆送到酶-2上。酶-2上也

$ACP \sim S-C(=O)-CH_2$ ，然后 $ACP \sim S-C(=O)-CH_2$ 靠 ACP 的长臂摆送到酶-2上。酶-2上也

有一个-SH 接受 ACP—



为酶-2-S-C-CH₃, 因而 ACP~SH 又可摆到酶-3上, 把酶-3 上的丙二酰基接下来, 并重新回到酶-2处, 酶-2即催化二者的缩合, 形成 β-酮脂酰-S~ACP.

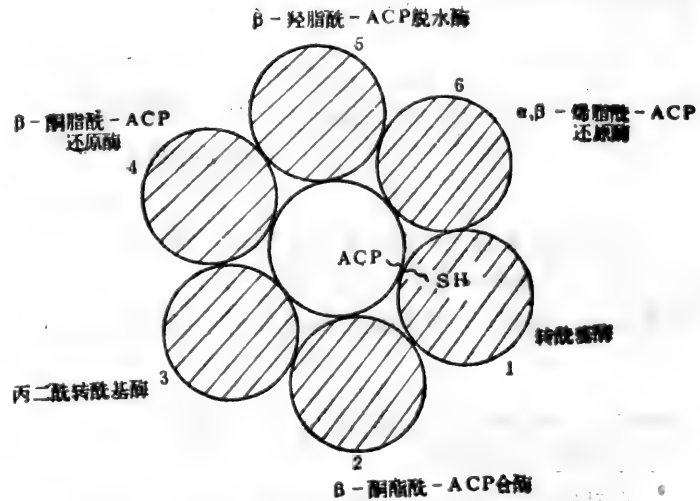
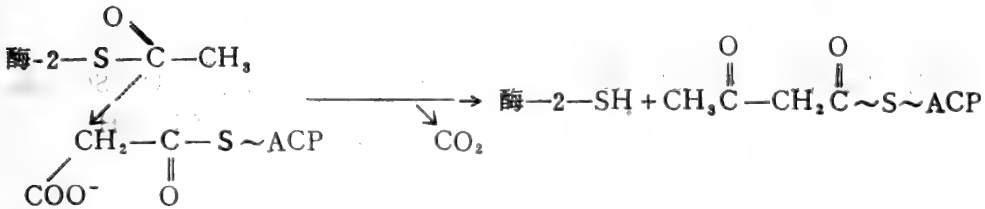
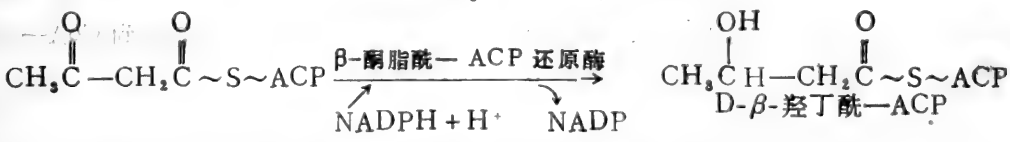


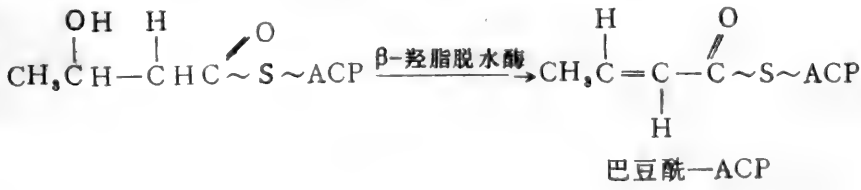
图10-7 催化大肠杆菌软脂酸合成的多酶复合体



② ACP 带着 β-酮脂酰, 将柔性臂摆到酶-4处, β-酮脂酰-S~ACP 的 β-酮基在该酶还原下形成 β-羟脂酰-S~ACP. 这个酶需 NADPH 为氢供体。

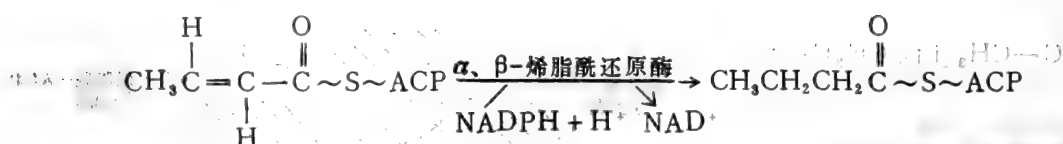


③ β-羟脂酰-S~ACP 靠 ACP 的柔性臂又摆到酶-5处, 该酶催化 β-OH 和 α-H 脱水生成 α,β-烯脂酰-ACP, 该烯脂酰为反式结构。



④ ACP~S-C(=O)-CH=CH₂, 又靠 ACP 的柔性臂摆到酶-6处, 在那儿酶-6把烯

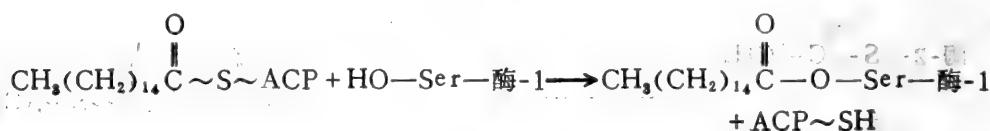
脂酰还原成脂酰—ACP。



这样脂肪酸合成的第一轮循环结束。第一轮形成的丁酰—S~ACP 靠 ACP 柔性臂带到酶-2把丁酰基转移到酶-2的一SH上，ACP~SH 又摆到酶-3上接受丙二酰基，再开始第二轮循环。每循环一次脂肪酸链延伸两个碳原子。经七次循环，获得软脂酰—S—ACP。由

于酶-2-β-酮脂酰合酶的活性中心不能快速攻击 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{C}(=\text{O})\text{S}\sim\text{ACP}$ 的脂酰基，因而不能形成更长的脂酰链。

在动物组织中有一个酶称脱酰酶，它能在软脂酰—S~ACP 的软脂酰基移至酶-1的Ser—OH以后，把它水解成软脂酸。



而在微生物中，这个 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{C}(=\text{O})\text{O-Ser-酶-1}$ 的软脂酰基，可转移到 CoA—SH 的一SH上，形成软脂酰—CoA，把酶-1—Ser—OH 释放出来。



哺乳动物的软脂酸合成酶同样也是经上述反应，经七轮循环而得软脂酸的。软脂酰—CoA能使软脂酰合成酶的两个亚基解离，而抑制其活性。真核生物的软脂酰合成酶，如酵母的合成酶，具有 α, β 结构，这两个亚基功能不同， α -亚基由ACP、β-酮脂酰合酶和β-酮脂酰还原酶组成。β-亚基由乙酰—转移酶、丙二酰转移酶(在酵母中它与软脂酰转酶相等)、β-羟脂酰脱水酶和烯脂酰还原酶构成(见图10—8(b))。

关于大肠杆菌脂酰合成酶的酶复合体及其反应示如图10—8(a)。

鼠肝、鸽肝和许多其它组织细胞液中的脂肪酸合成酶系，已被纯化。肝酶的 $M \cdot W = 500,000$ ，具有两个明显的多肽($M \cdot W = 240,000$)，每个这种大肽含一分子磷酸泛酰巯基乙胺，这可认为每个多功能肽含一个 ACP 区。肽的所有活性都是用以合成脂肪酸，同时还有

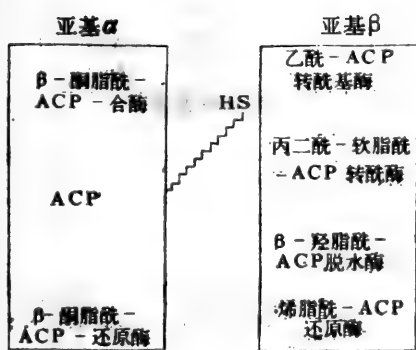
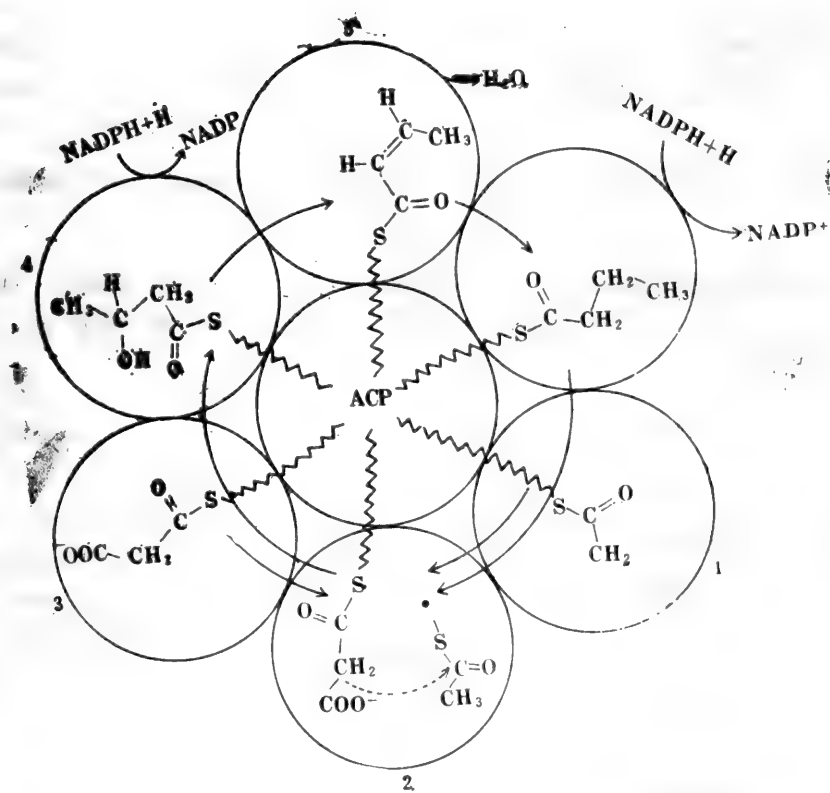


图10—8 (a)大肠杆菌脂肪酸合成酶多酶复合体及其所催化的反应。
(b)酵母脂肪酸合成酶多酶复合体的可能排列。

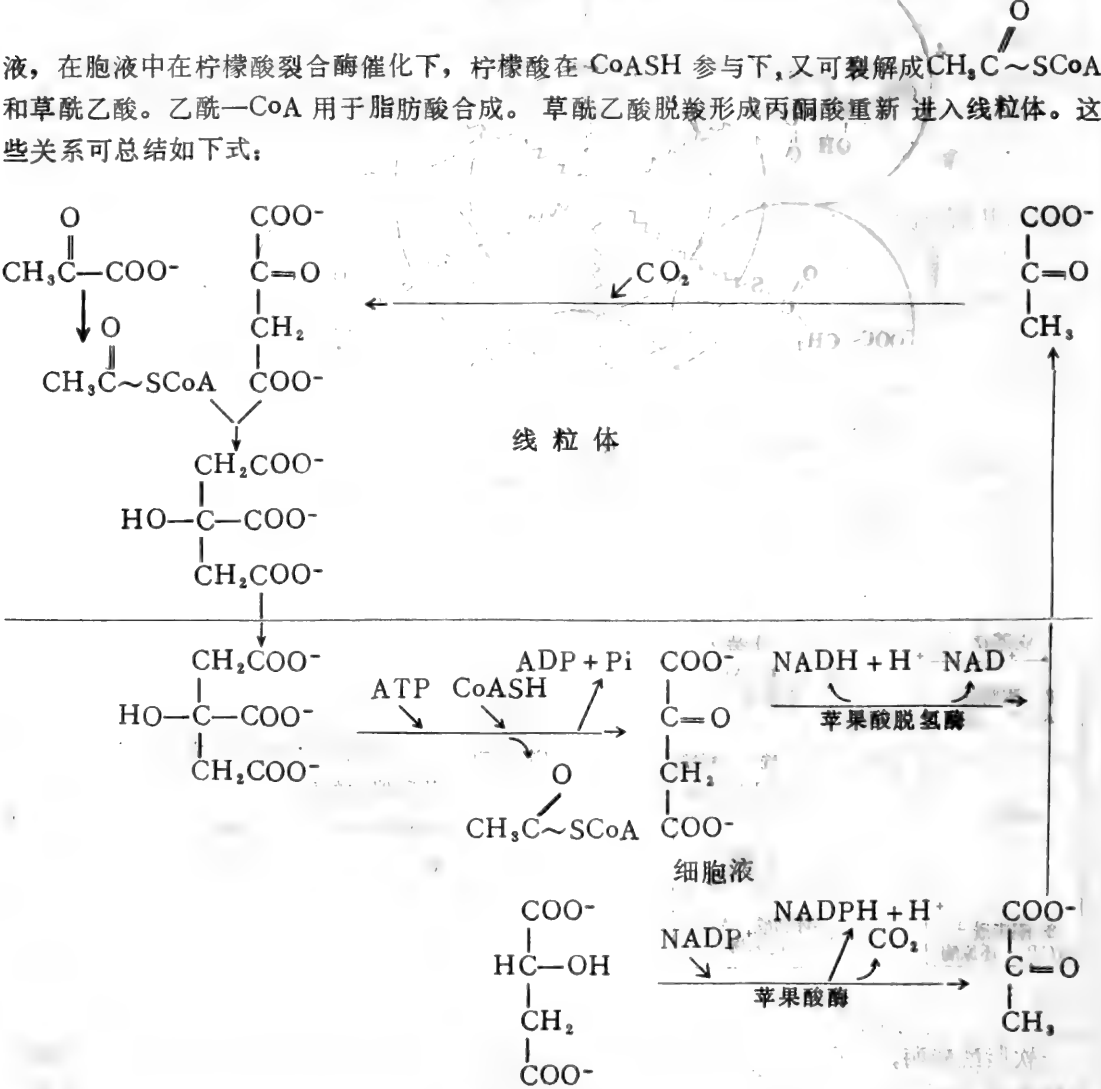
一个软脂酰酯酶，从酶上水解出一个软脂酸。近来有证据表明，在 CoA 存在下，软脂酰部分转移到 CoA 上。在这多功能多肽中，酶活性的三维排列是近代研究中一个有趣的问题。很明显，多功能肽的形式可免去中间物累积，并且能等化学计量地提供每一种酶活性组分，这是真核细胞脂肪酸合成酶系比细菌的多功能复合体更为优越之点。

(三) 脂肪酸合成与其它代谢途径的关系及其调节

脂肪酸合成需要 $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\sim\text{SCoA}$ 为材料，需要 NADPH 提供还原力和能源。 $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\sim$

SCoA 可来自脂肪酸的 β -氧化, 亦可来自糖酵解终产物丙酮酸的脱羧氧化。但糖酵解和脂肪酸氧化都在线粒体中进行, 而脂肪酸的合成在细胞液中进行, 乙酰—CoA 又不能穿过线粒体膜到胞液中来。从糖代谢中不难想象, 在脂肪酸合成时可由以下途径解决这个原料问题。

$\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\sim\text{SCoA}$ 在线粒体中可与草酰乙酸缩合成柠檬酸, 柠檬酸可以穿过线粒体膜进入胞液, 在胞液中在柠檬酸裂合酶催化下, 柠檬酸在 CoASH 参与下, 又可裂解成 $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\sim\text{SCoA}$ 和草酰乙酸。乙酰—CoA 用于脂肪酸合成。草酰乙酸脱羧形成丙酮酸重新进入线粒体。这些关系可总结如下式:



关于 NADPH 的来源问题, 除了上述苹果酸酶所催化的反应中有 NADPH 生成外, 其主要来自磷酸戊糖途径。糖尿病患者 G—6—P 脱氢酶活性很低, NADPH 生成量少, 从而限制了脂肪酸的合成速度。

柠檬酸不仅可提供脂肪酸合成材料— $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\sim\text{SCoA}$, 在哺乳动物中柠檬酸又能激活脂

酸合成反应中控制，限速步骤的乙酰—CoA 羧化酶，使它由非活性形式聚合成活性形式，从而也加快脂肪酸的合成速度。

二、脂肪酸的碳链延伸

脂肪酸从头合成只能形成软脂酸，要合成 C_{16} 以上的脂肪酸，必须继续把碳链延伸。生物体有两个脂肪酸链延伸系统。

(一) 线粒体脂肪酸的延伸

线粒体含有一种酶复合物，催化已合成脂肪酸的延伸，它与脂肪酸合成酶不同之处有：

O

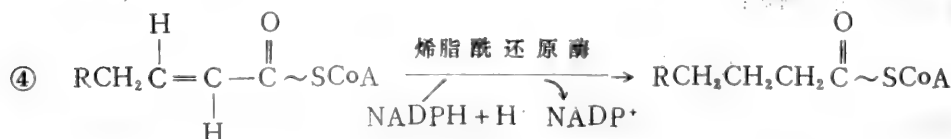
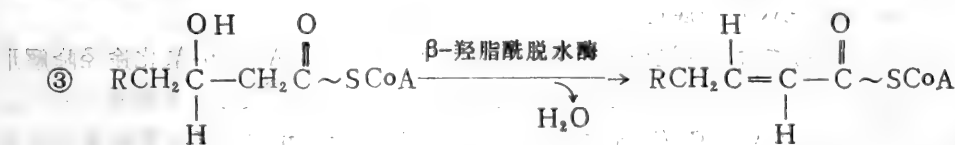
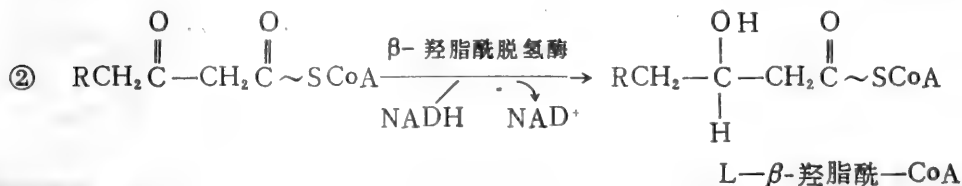
①以 $CH_3C(=O) \sim SCoA$ 而不以丙二酰—CoA 作延伸碳链。

② β -酮脂酰—CoA 的还原，是以 NADH 提供还原力，而不用 NADPH。

③反应过程中的各酰基载体为 CoASH，而不是 ACP—SH。即反应过程中各种形式的酰基，都是以酰基—CoA 形式参与反应，而不是以酰基—ACP 形式参与反应。

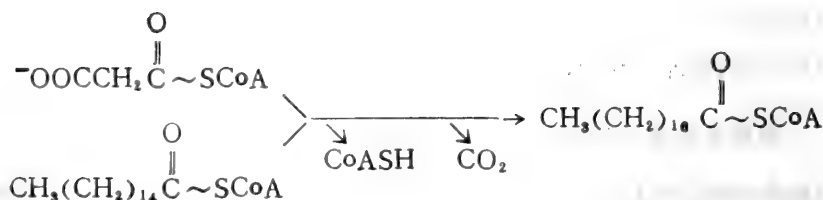
所以这个延伸系统类似于 β -氧化的逆反应，但又不完全一样。 β -氧化脂酰—CoA 脱氢酶以 FAD 为辅基，而延伸系统的烯脂酰还原酶的辅酶则为 NADPH，

这个系统不仅能延伸饱和脂肪酸，也能催化不饱和脂肪酸的延伸。整个反应及所需的酶示如下式：



(二) 微粒体脂肪酸延伸系统

这个延伸系统可延伸饱和脂肪酸，也可延伸不饱和脂肪酸。它以丙二酰—CoA 作为延伸碳源。缩合时都以酰基—CoA 形式缩合，其它则与脂肪酸合成酶系相同。



植物中的延伸系统与脂肪酸合成酶系完全一样。

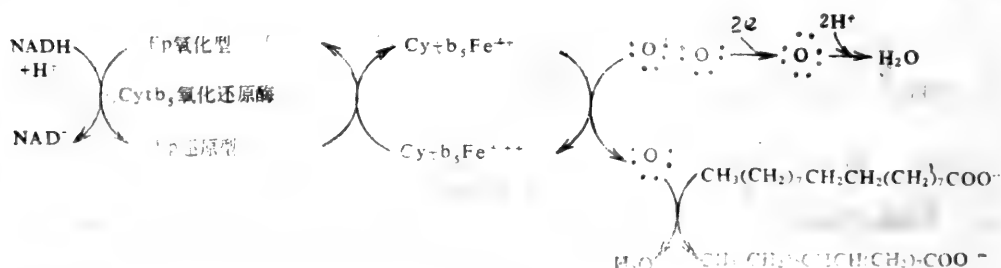
三、不饱和脂肪酸的合成及脂肪酸间的互变

(一) 单不饱和脂肪酸的形成

Δ^9 -单不饱和脂肪酸是通过与微粒体结合的一个脱饱和酶复合物催化而合成。该复合物含有细胞色素 b_5 (Cyt b_5)、NADH—Cyt b_5 还原酶和一个脱饱和酶。硬脂酰—CoA 脱饱和酶催化油酰—CoA 的形成。软脂油酰—CoA 由软脂酰—CoA 转变而成。在这些转变反应中， O_2 是不可缺少的。所有哺乳动物脱饱和酶都需要 O_2 。

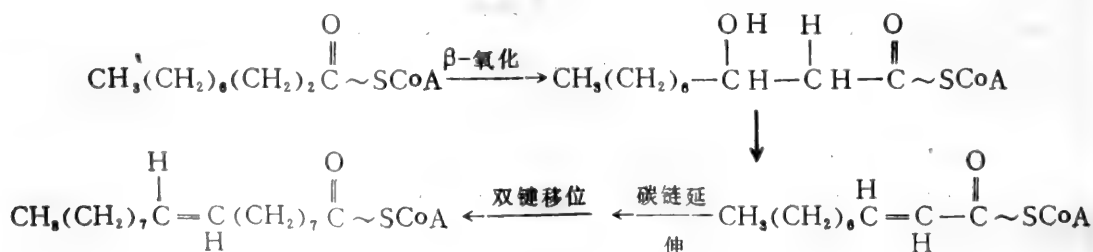
哺乳类脂肪组织中所含的主要不饱和脂肪酸是油酸，它由硬脂酸脱饱和而成。因此从头合成的软脂酸，得先经链延伸成硬脂酸。

人体、动物及大部分需氧生物的单不饱和脂肪酸的形成机制如下式。



植物形成单不饱和脂肪酸的机制与此类似，但以铁氧还蛋白代替 Cyt b_5 ，脱饱和酶是可溶性的，可以硬脂酰—ACP 为底物。

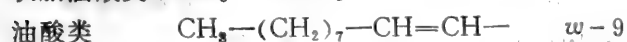
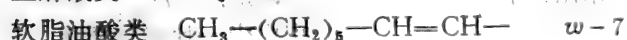
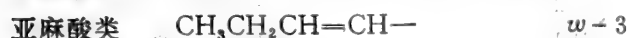
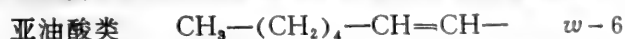
另一个单不饱和脂肪酸合成的途径不需氧，它首先由脂酰—CoA 经 β -氧化途径降解形成中等长度的 β -羟脂酰—CoA，也可由脂肪合成途径中所生成的中等长度的羟脂酰—ACP，脱水生成 α, β -烯脂酰—CoA 或 α, β -烯脂酰—ACP。然后靠脂肪酸的链延伸机制生成较长链的不饱和脂肪酸。例如：



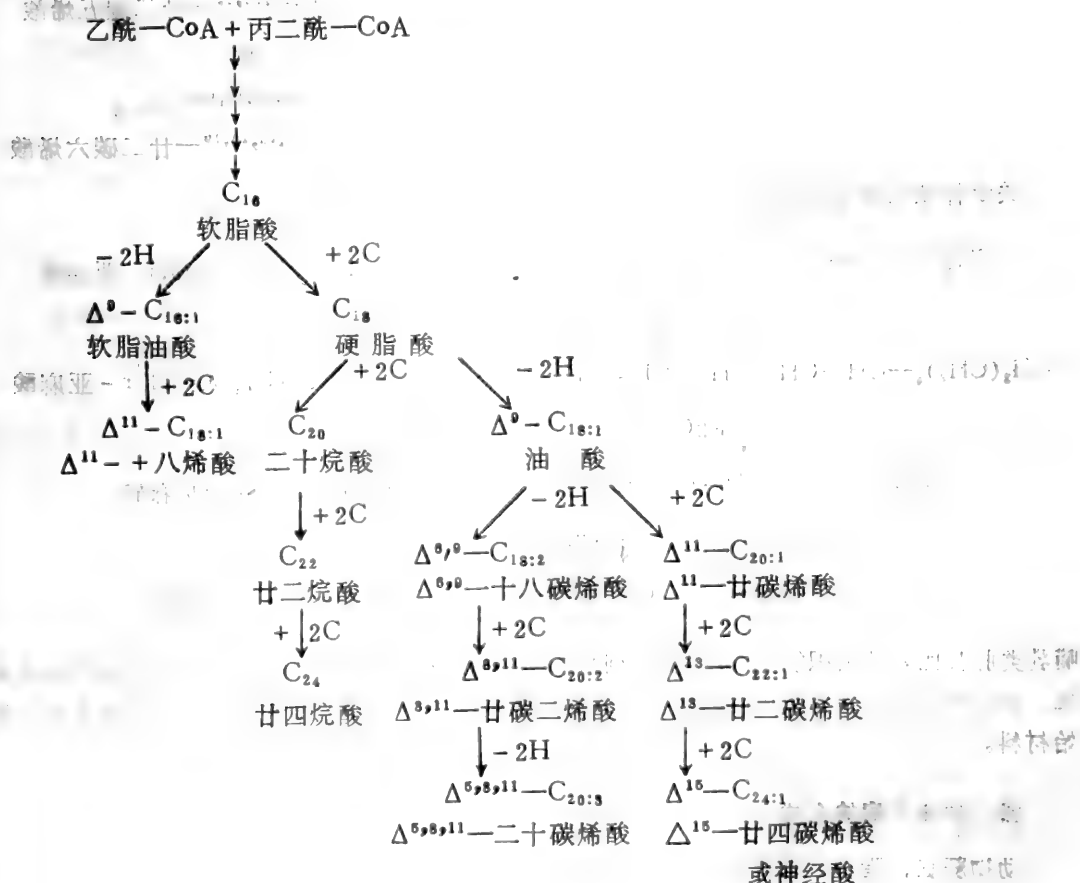
(三) 多不饱和脂肪酸的合成和相互转变

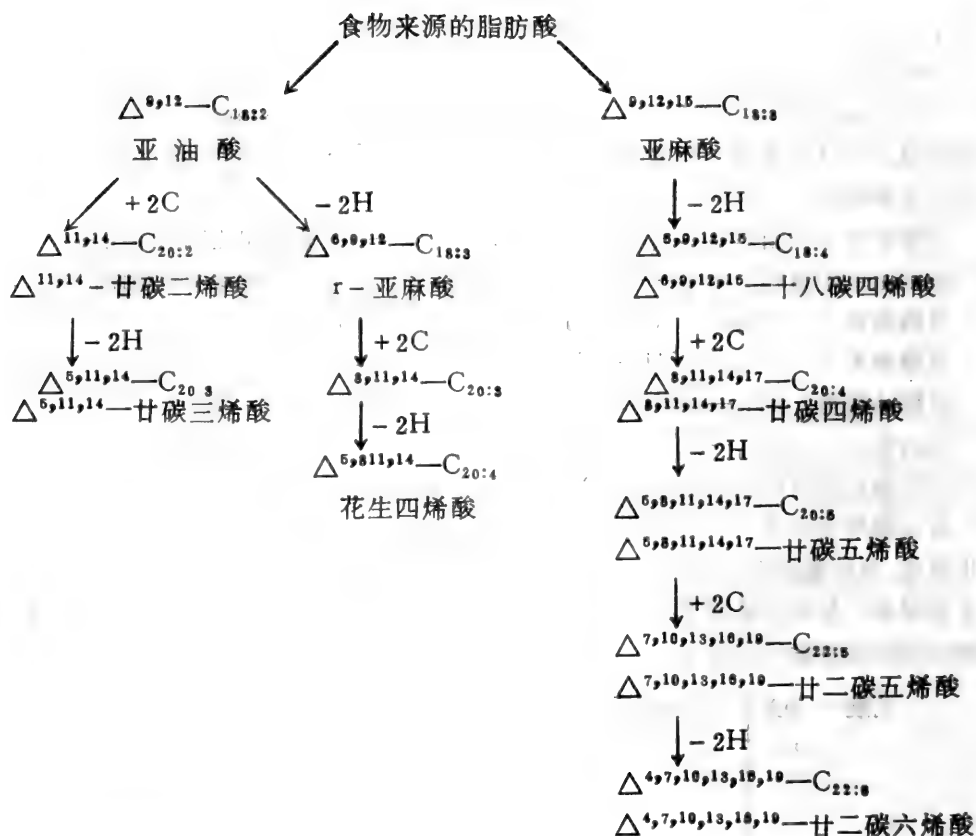
动物体含有各种多不饱和脂肪酸。其中有一类是动物本身制造的。这些脂肪酸的双键都处于从 $-\text{CH}_3$ 端和 $-\text{COO}^-$ 端数起第七位碳之间，这些脂肪酸由油酸脱饱和和链延伸而获得。然而双键位于从末端起七个碳以内任一位置的多不饱和脂肪酸，则动物本身不能制造，它们主要由食物供给。

在哺乳类中有四类多不饱和脂肪酸。其中两种——亚油酸和亚麻酸类型由食物供给，而另两种则由单不饱和脂肪酸——油酸和软脂油酸合成。这四类离 ω 甲基端距离可表示如下：

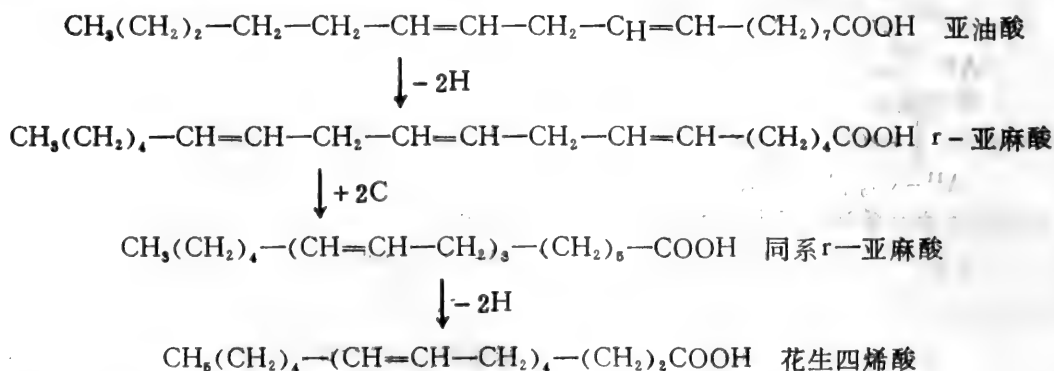


其它多不饱和脂肪酸都能由这四种前体经一系列反应合成。其中的键是交替延伸和脱饱和。延伸可通过利用丙二酰-CoA 的微粒体系统的酶催化。脱饱和作用也是由微粒体组分中的酶催化完成。其脱饱和机制类似于单不饱和酸，但不完全相同。具有共轭双键的不饱和酸在动物中不能形成，廿碳四烯酸等的多不饱和酸也不能形成。下式是动物组织中不同的多不饱和脂肪酸生成的各种途径的总结。





关于廿碳四烯酸的形成详情如下:



哺乳类肝脏比肝外组织能更广泛地进行脱饱和及延伸反应。多不饱和脂肪酸虽然也能发生氧化,但这些脂肪酸并非体内的重要能源。花生四烯酸和同系 γ -亚麻酸是形成前列腺素的原始材料。

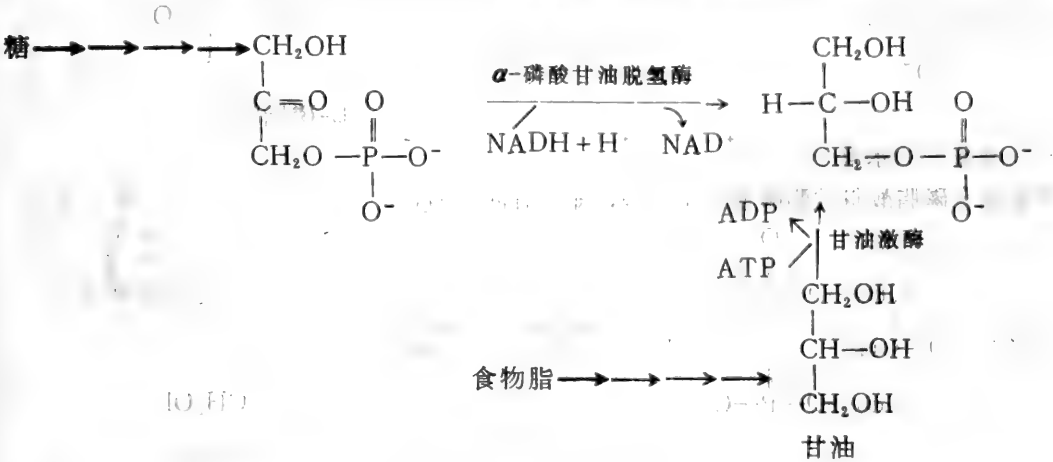
四、甘油三酯的合成

动物肝脏、脂肪组织及高等植物都能大量合成三酰甘油,微生物则合成减少。合成途径

是由脂酰-CoA和 α -磷酸甘油经磷脂酸而合成。

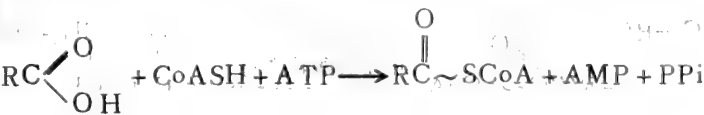
(一) α -磷酸甘油的来源

α -磷酸甘油可由糖酵解中间物——磷酸二羟丙酮在 α -磷酸甘油脱氢酶催化下 还原而形成，也可由脂肪水解生成的甘油，在 ATP 参与下经甘油激酶催化而形成。



(二)脂酰-CoA 的合成

在细胞质中，在脂酰-CoA 合成酶催化下即可形成脂酰-CoA。

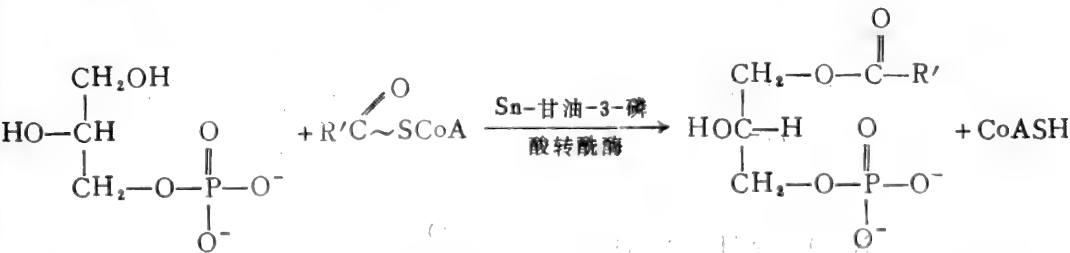


(三)脂肪合成

脂肪合成分几个步骤进行。

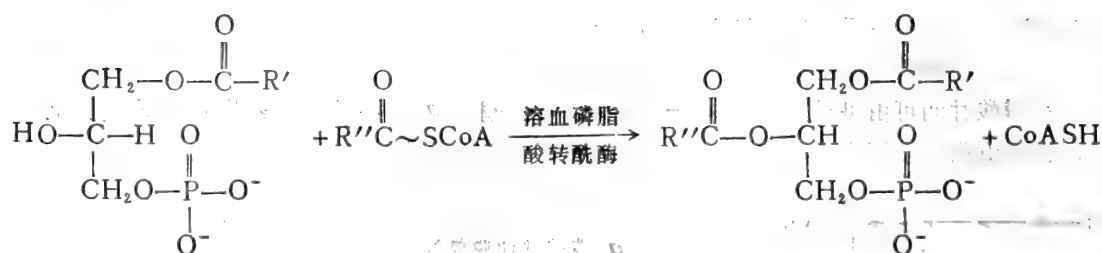
1. 1-酰基甘油-3-磷酸的合成

在 Sn-甘油-3-磷酸转酰酶的催化下，脂酰-CoA 与 α -L-甘油-3-磷酸反应生成1-酰-甘油-3-磷酸，又名溶血磷脂酸。



2. 磷脂酸的形成

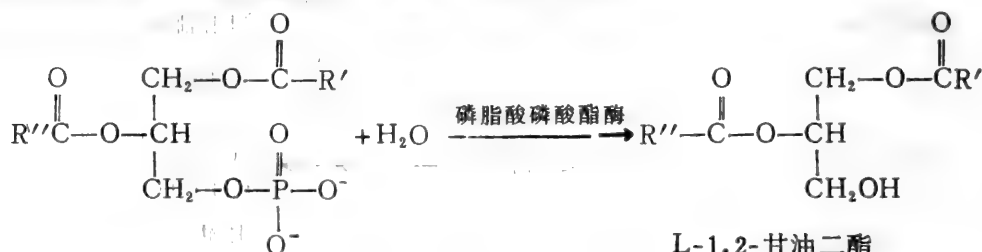
溶血磷脂酸在溶血磷脂酸转酰酶催化下，再与第二个脂酰-CoA 反应，形成磷脂酸。它是合成三酰甘油和一些磷脂的前体。



L-磷脂酸

3. 磷脂酸的水解

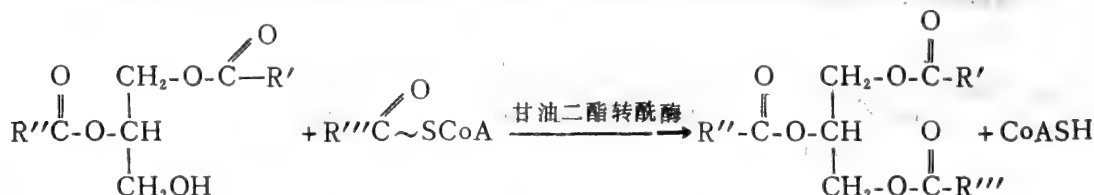
磷脂酸在磷脂酸磷酸酯酶催化下水解，即成甘油二酯。



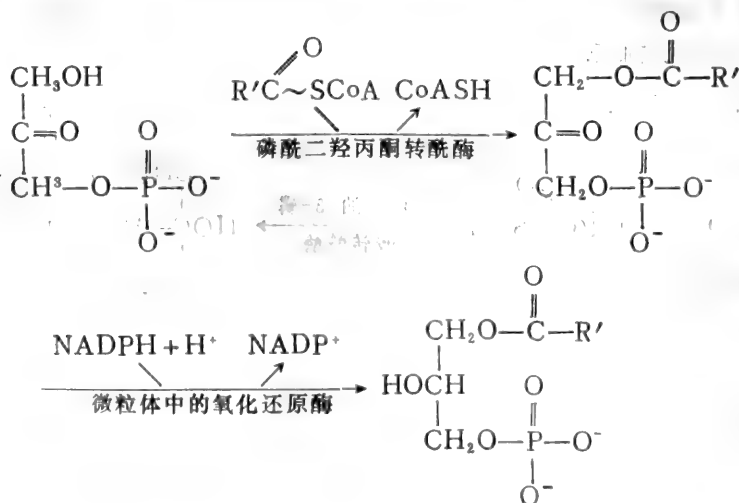
L-1,2-甘油二酯

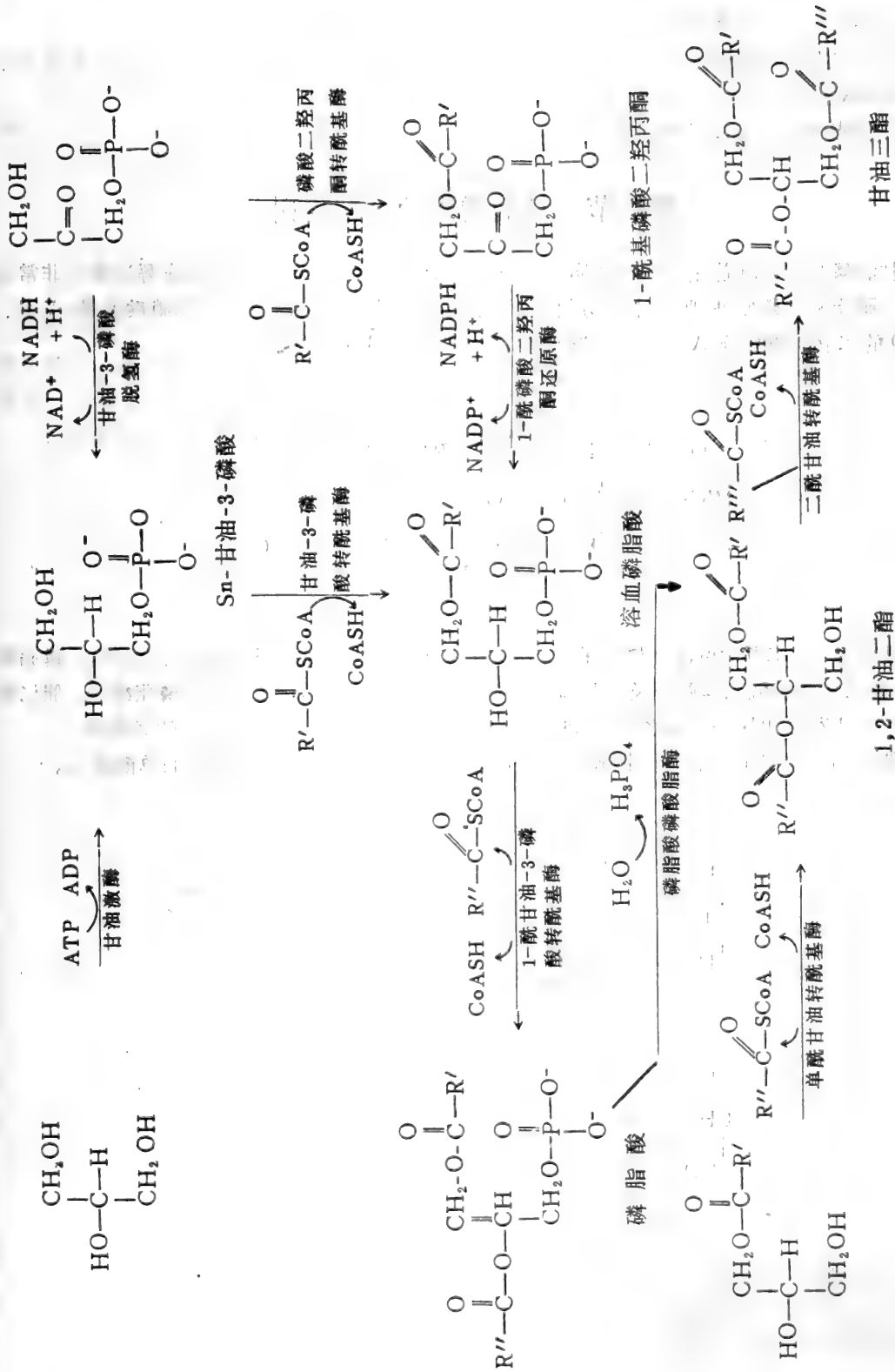
4. 甘油三酯的形成

甘油二酯在甘油二酯转酰酶催化下与第三个脂酰-CoA 反应即形成甘油三酯。



除通过以上四个途径合成甘油三酯外，还可通过磷酸二羟丙酮合成磷脂酸，再合成脂肪。反应如下。式中磷酸二羟丙酮转酰酶存在于过氧化体和微粒体中，它专一性催化饱和脂酰-CoA 的反应



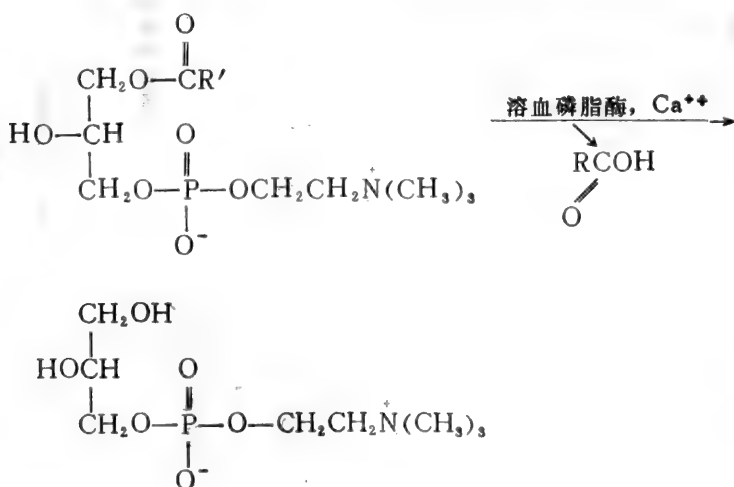


还有些微生物能使甘油-3-磷酸与脂酰-ACP 反应合成溶血磷脂和磷脂, 而且其效果比辅酶 A 更高。

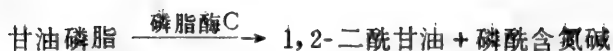
第四节 甘油磷脂的分解代谢

$$\begin{array}{c}
 \text{O} \quad \text{B} \quad \text{CH}_2\text{-O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{R}' \\
 \parallel \quad \swarrow \quad | \\
 \text{R}''\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{H} \\
 | \quad \quad \quad \text{O} \\
 \text{CH}_2\text{-O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \\
 \quad \quad \quad \swarrow \quad | \quad \nwarrow \\
 \quad \quad \quad \text{C} \quad \text{O}^- \quad \text{D}
 \end{array}$$

脾脏和其它组织的溶血磷脂酶作用于溶血磷脂酰胆碱或磷脂酰乙醇胺的单酯键 A。



458

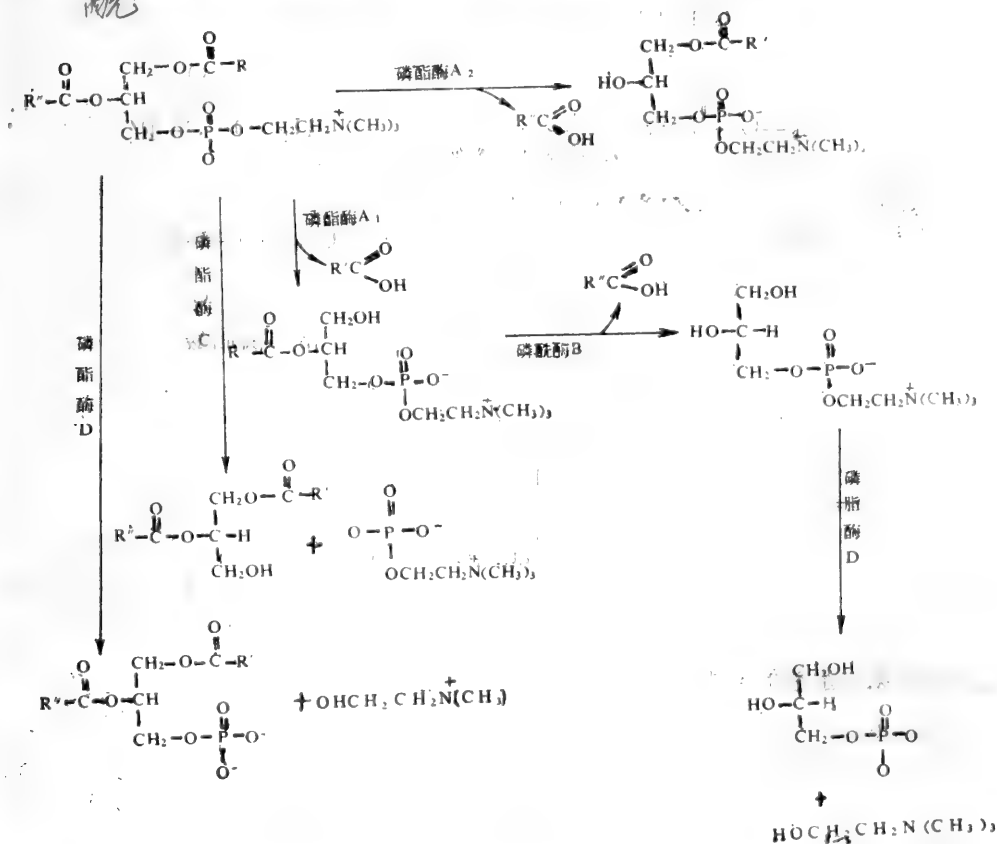


在植物中的磷脂酶 D 催化磷脂酶转移反应和 D-键磷酸二酯键的水解反应。它可催化胆碱、乙醇胺、丝氨酸或甘油与磷脂酸所形成的 D 键水解。



以上两个反应都可被 Ca^{++} 激活。上述反应②可使自由丝氨酸、乙醇胺或胆碱与甘油磷脂交换含氮碱。这个反应也存在于脑的微粒体中。目前已证实这个反应是合成丝氨酸磷脂的主要途径。

以磷酸胆碱为例，磷脂的分解代谢反应总结如下：



第五节 甘油磷脂的合成

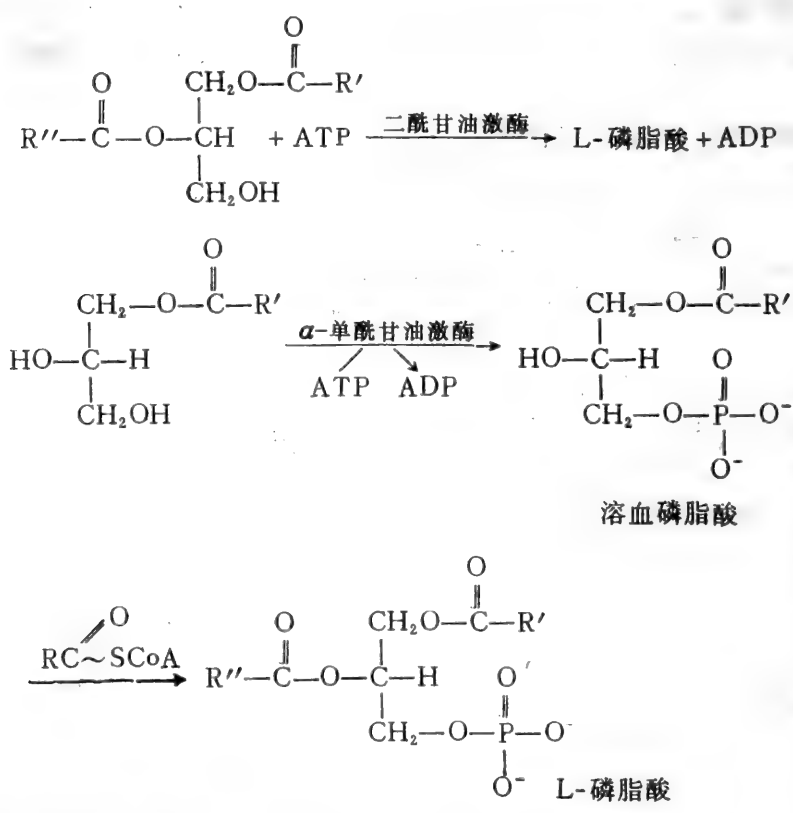
甘油磷脂广布于生物界，是最主要的一类磷脂。含丝氨酸、乙醇胺或胆碱的磷脂都能在

生物体内自行合成。生物体含量最多的磷脂酰一胆碱（卵磷脂）可从磷脂酰乙醇胺合成，也可由食物的胆碱从头合成。不管那种磷脂的合成，都首先要合成磷脂酸。

一、磷脂酸的合成

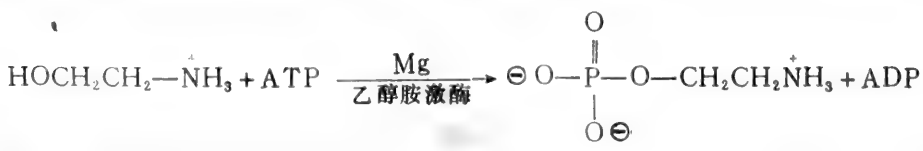
磷脂酸是甘油磷脂合成的关键物质。从甘油-3-磷酸或磷酸二羟丙酮合成磷脂酸已如上述，此外从三酰甘油亦可形成磷脂酸。摘要如下：

首先使三酰——甘油水解成二酰甘油，或 α -二酰甘油。1,2-二酰甘油在二酰甘油激酶催化下形成磷脂酸。 α -二酰甘油在脑组织或肠粘膜的激酶催化下形成 L-溶血磷脂酸。然后再转变为磷脂酸。

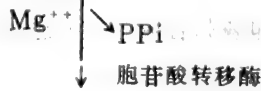


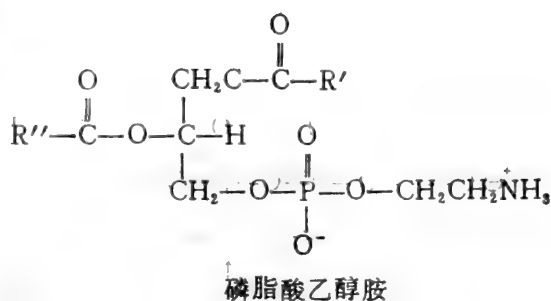
二、磷脂酰乙醇胺的合成

乙醇胺首先被乙醇胺激酶催化磷酸化，形成磷酸乙醇胺。



然后磷酸乙醇胺在胞苷酸转移酶催化下与 CTP 反应形成 CDP-乙醇胺。

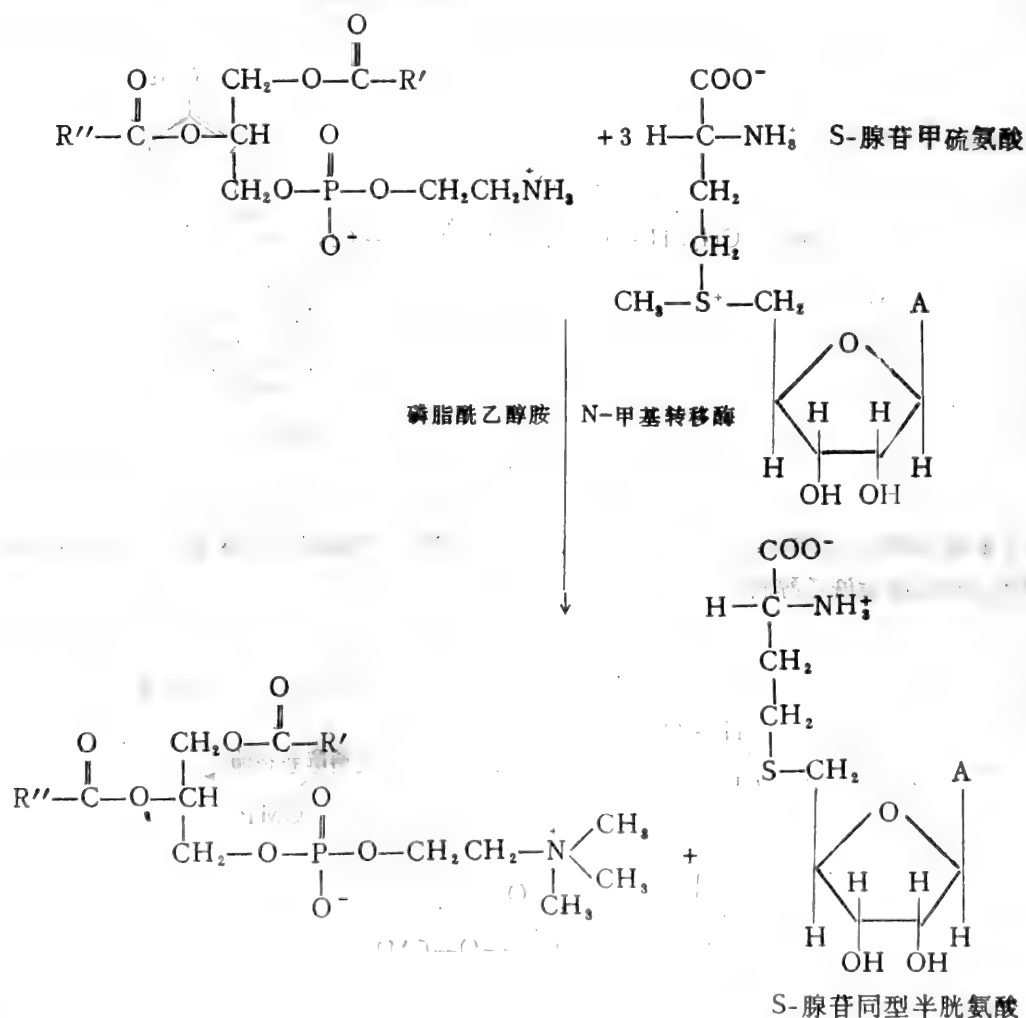




三、磷脂酰胆碱的合成

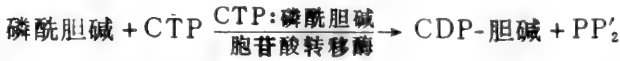
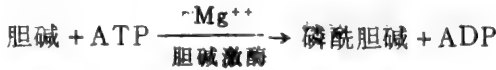
(一) 从磷脂酰乙醇胺合成磷脂胆碱

在 N-甲基转移酶催化和 S-腺苷甲硫氨酸参与 (甲基供体) 下, 磷脂酰乙醇胺被甲基化即成卵磷脂。这个途径是卵磷脂合成的主要途径。反应过程如下:



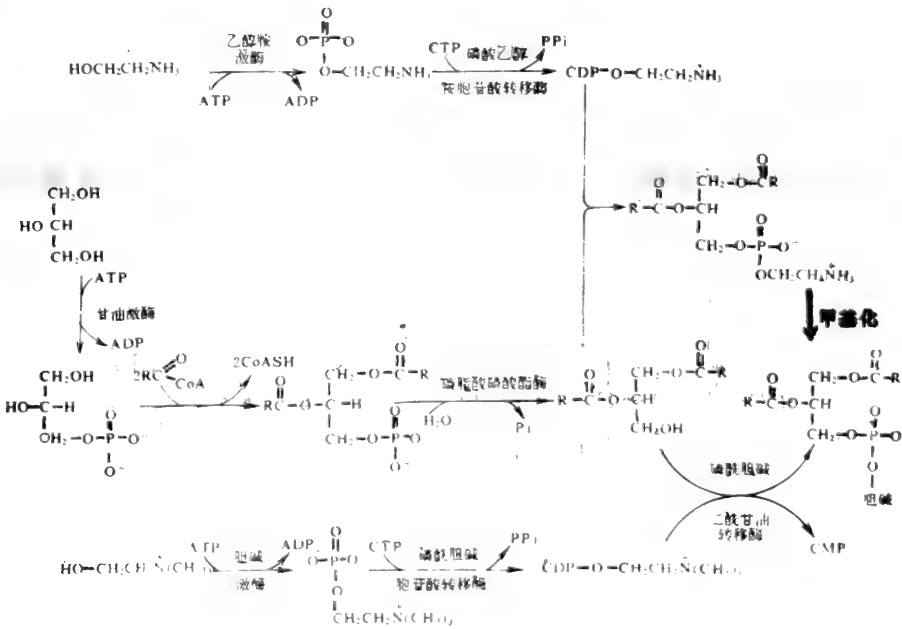
(二) 磷脂酰胆碱的从头合成

这个途径需要从食物中供给胆碱。胆碱首先在激酶作用下形成磷酸胆碱，然后在胞苷酸转移酶催化下形成 CDP-胆碱。反应类似于 CDP-乙醇胺。



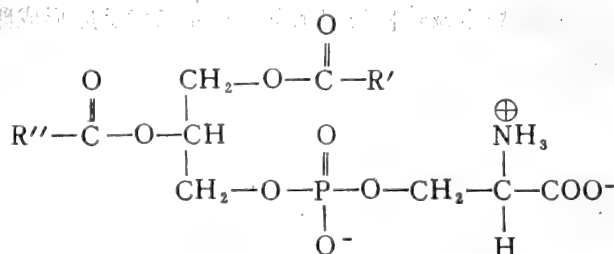
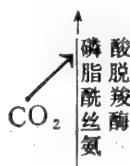
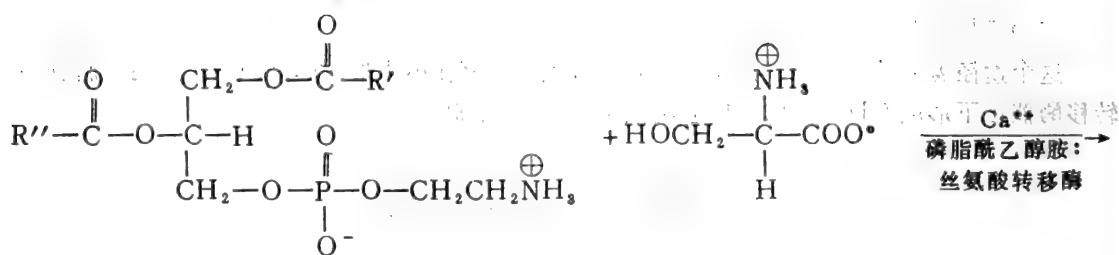
参与这第二步反应的酶在卵磷脂形成中是受调节的，它的活性可被二磷脂酰甘油（心磷脂）所刺激。

生成的 CDP-胆碱在磷酸胆碱转移酶催化下与甘油二酯反应形成卵磷脂。以上各种卵磷脂合成途径可总结如下。

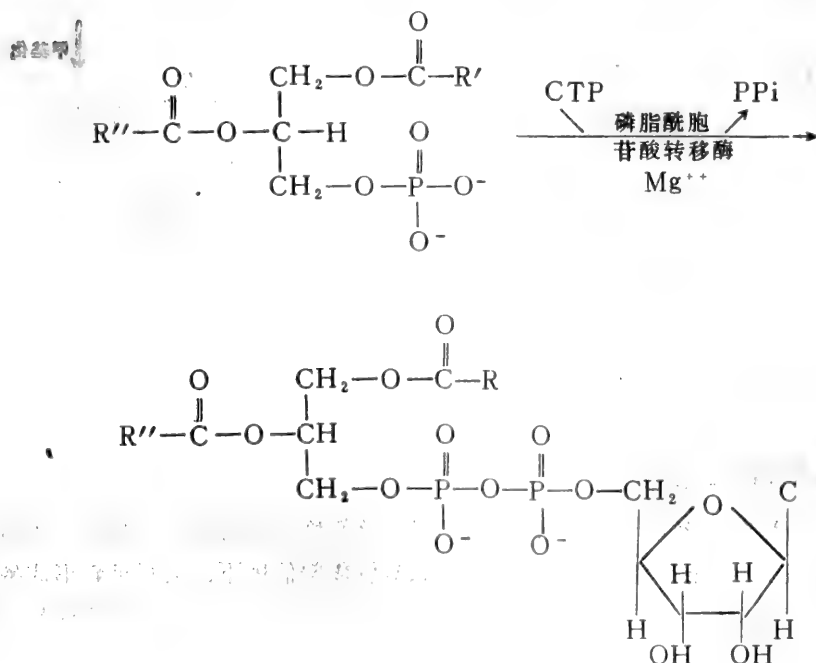


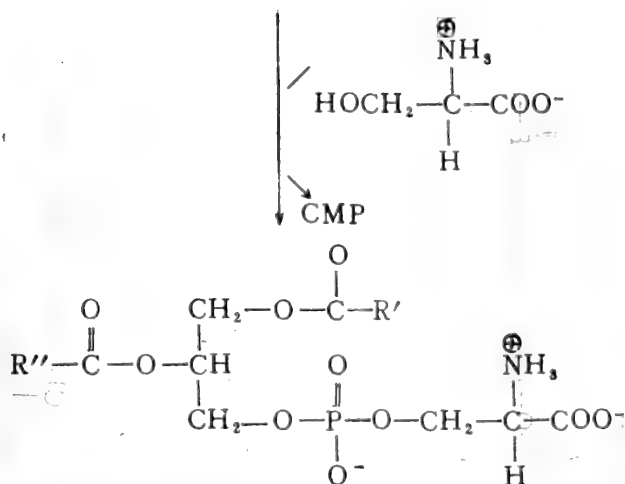
四、磷脂酰-丝氨酸的合成

在哺乳动物中磷脂酰-丝氨酸是由磷脂酰乙醇胺:丝氨酸转移酶催化含氮碱的置换反应而形成的。丝氨酸磷脂在含吡哆醛磷酸的磷脂酰丝氨酸脱羧酶催化下，又可重新形成磷脂酰乙醇胺。在大肠杆菌中，这个脱羧酶是一个膜结合酶，有一个 NH_2 一端丙酮酰残基对酶的作用很关键。



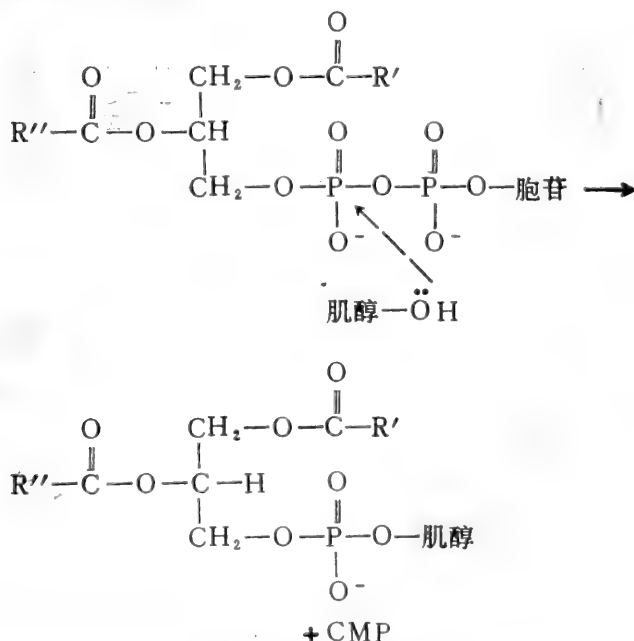
在大肠杆菌及其它细菌中，参与经由胞二磷二酰甘油合成磷脂酰一氨基酸的酶及反应如下。



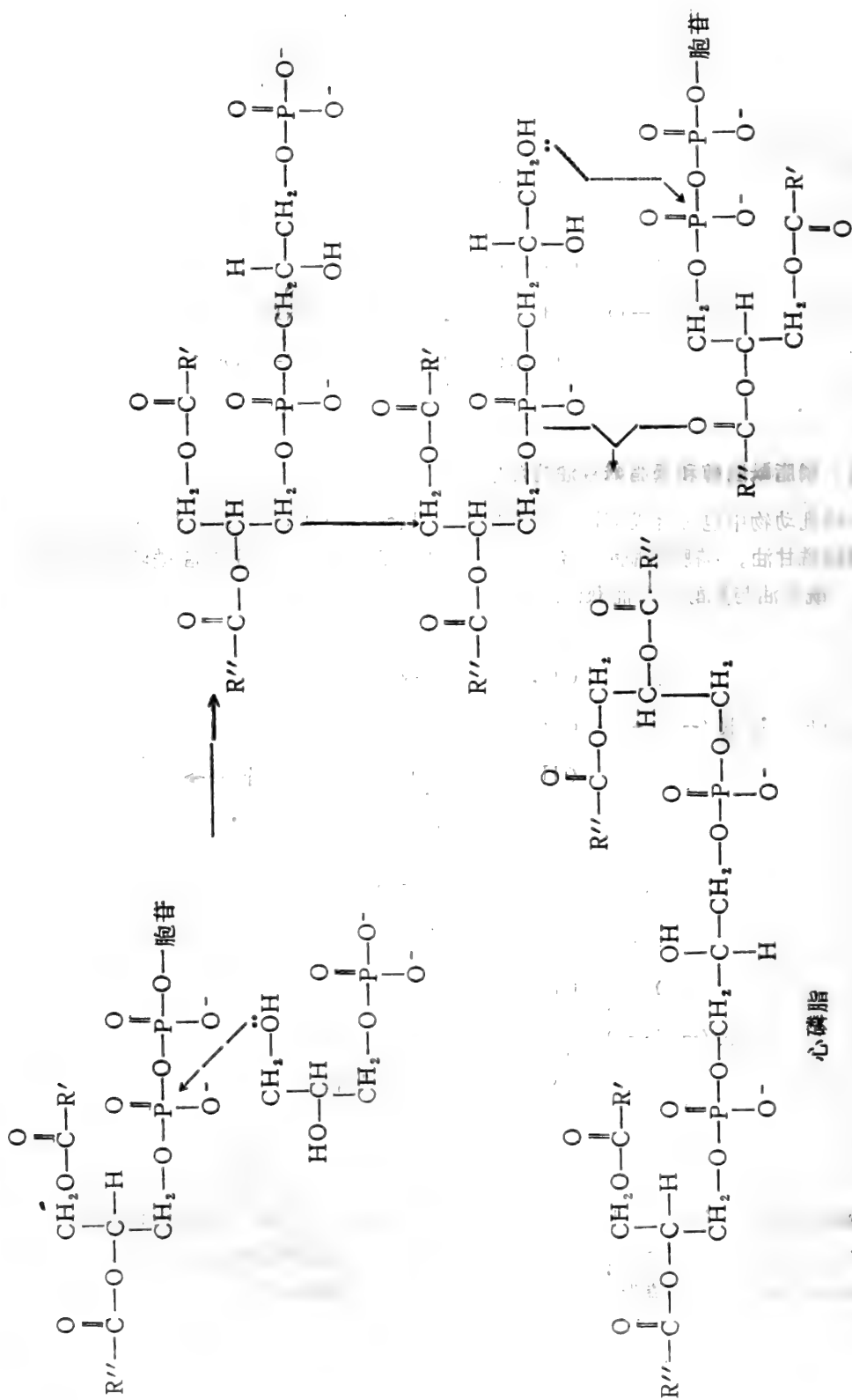


五、磷脂酰肌醇和磷脂酰甘油的合成

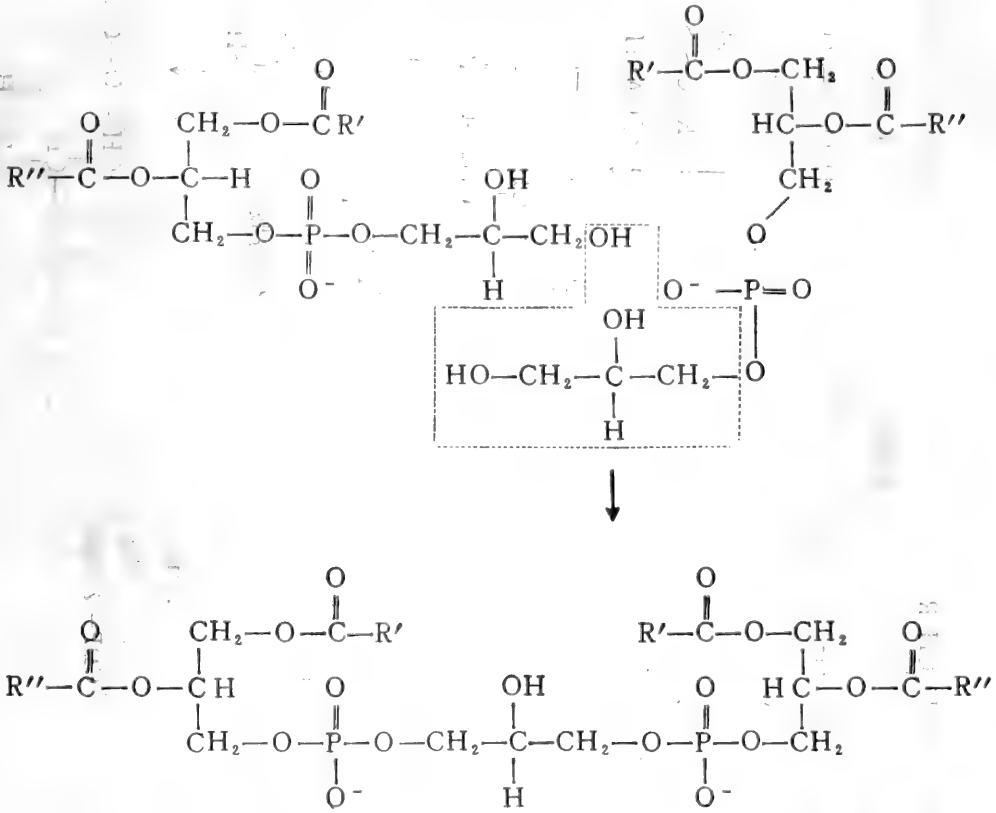
在哺乳动物中也可合成 CDP-二酰甘油，但合成的 CDP-二酰甘油是用来合成磷脂酰肌醇和磷脂酰甘油。磷脂酰肌醇的合成是在 CDP-二酰甘油：肌醇磷脂酰转移酶催化下，由 CDP-二酰甘油与肌醇作用而获得。



磷脂酰甘油的合成是在甘油磷酸磷脂酰转移酶催化下，由 Sn-甘油-3-磷酸的 α -OH 亲核攻击 CDP-二酰甘油分子上的 CDP-的 β -磷原子，生成磷脂酰甘油磷酸，然后再在磷脂酰甘油磷酸酯酶催化下，磷脂酰甘油磷酸脱去磷酸基而成磷脂酰甘油。甘油的一OH 再去亲核攻击 CDP-二酰甘油，即生成双磷脂酰甘油，又称心磷脂。它是线粒体内膜的主要成分，占其所含类脂成分的10—20%。它也是细菌细胞膜的主要成分。反应如下式：



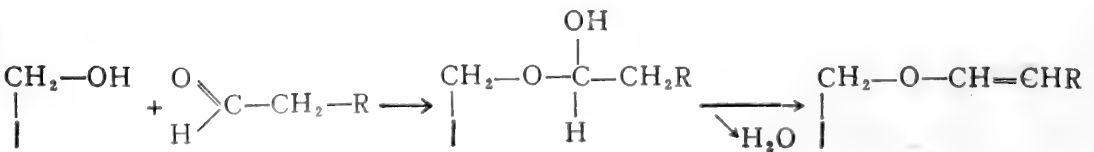
在细菌中两个磷脂酰甘油脱去一个甘油分子亦可生成心磷脂。



六、缩醛磷脂的合成

一脂酰磷酸二羟丙酮的形成已如上述，在一未知酶的作用下，其脂酰基被一个醇所取代，然后在一脱氢酶作用下，二羟丙酮的酮基被还原即成为缩醛磷脂酸，然后进一步按上述一些步骤合成缩醛磷脂。反应见 P468

在缩醛磷脂中，甘油上的 α -OH 可看作是与一个 $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{R} \end{array}$ 分子缩合而成的半缩醛，经脱水而成，故名为缩醛磷脂，甘油 α -OH 与醇之间实际上以醚键相连。

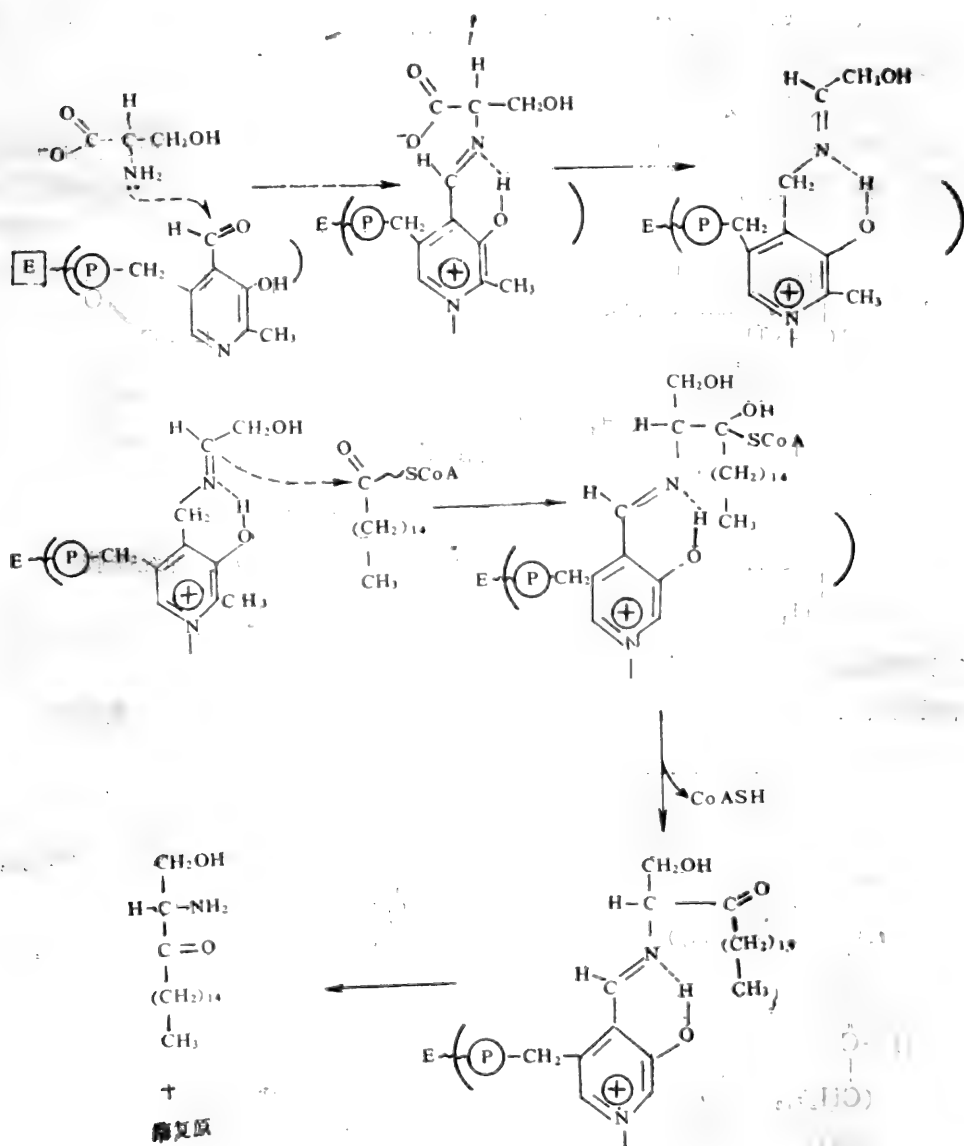


第六节 鞘磷脂和其它鞘脂类的合成

一、鞘磷脂的生物合成

鞘磷脂在生物体内的合成分三步进行。第一步是合成鞘氨醇；第二步是鞘氨醇的-NH₂被脂酰-CoA 酰化，形成酰胺键，合成神经酰胺。第三步是鞘氨醇的末端羟基与 CDP-碱作用形成鞘磷脂。

(一) 鞘氨醇的形成



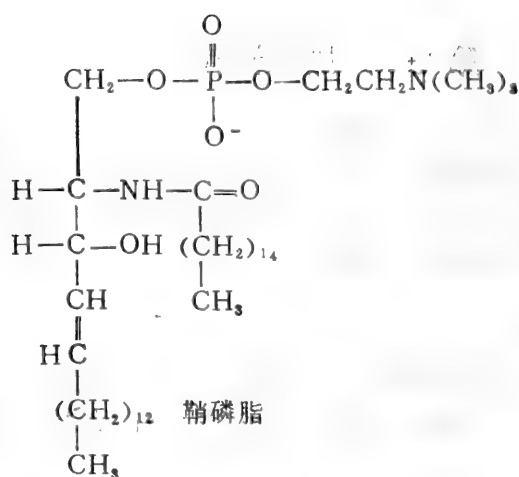


(二)神经酰胺的形成

(三) 鞘磷脂的形成

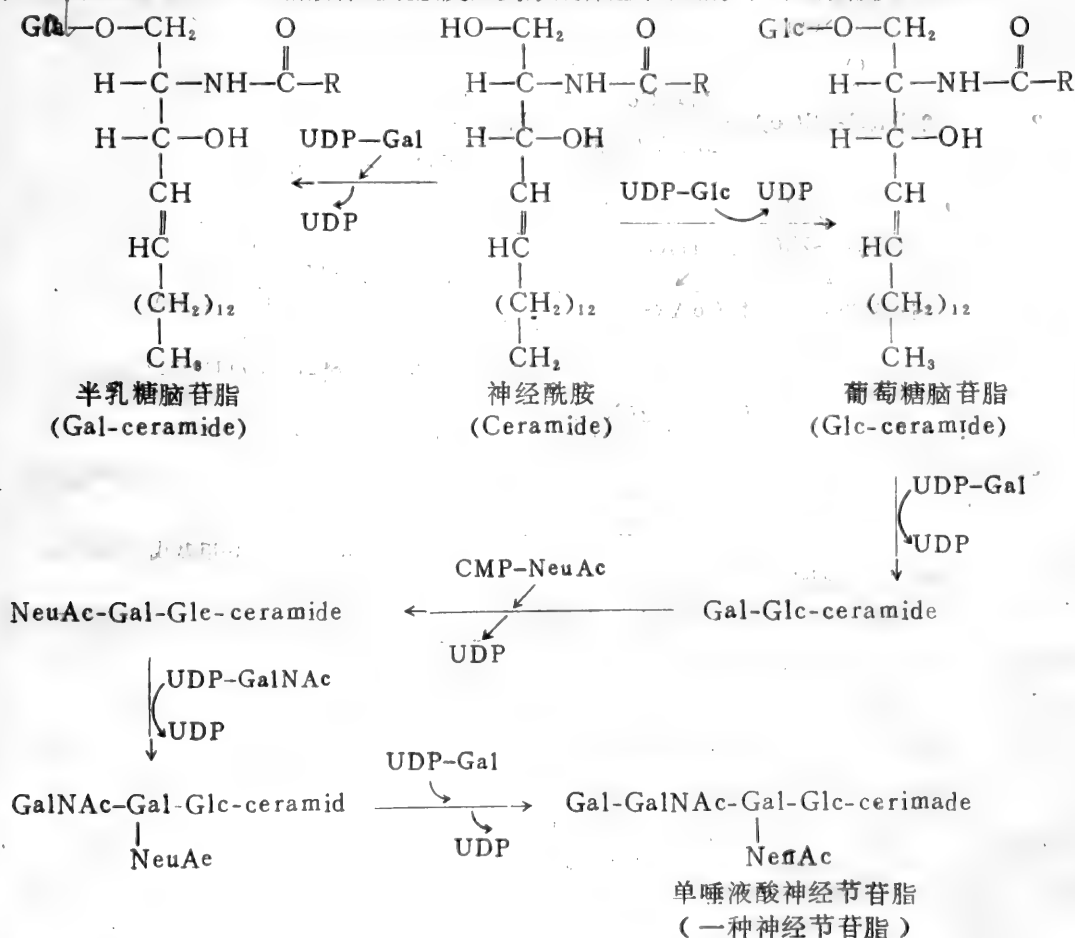
神经酰胺末端的伯醇-OH, 亲核攻击 CDP 胆碱的 β -磷原子, 即生成鞘磷脂。





二、其它鞘脂类的合成

神经酰胺能与 UDP-葡萄糖或 UDP-半乳糖等反应，生成脑苷脂类。如果与 UDP-糖作用后继续和 CMP-N-脂酰神经酰胺反应则形成神经节苷脂。其中有关反应如下式：



第七节 固醇代谢

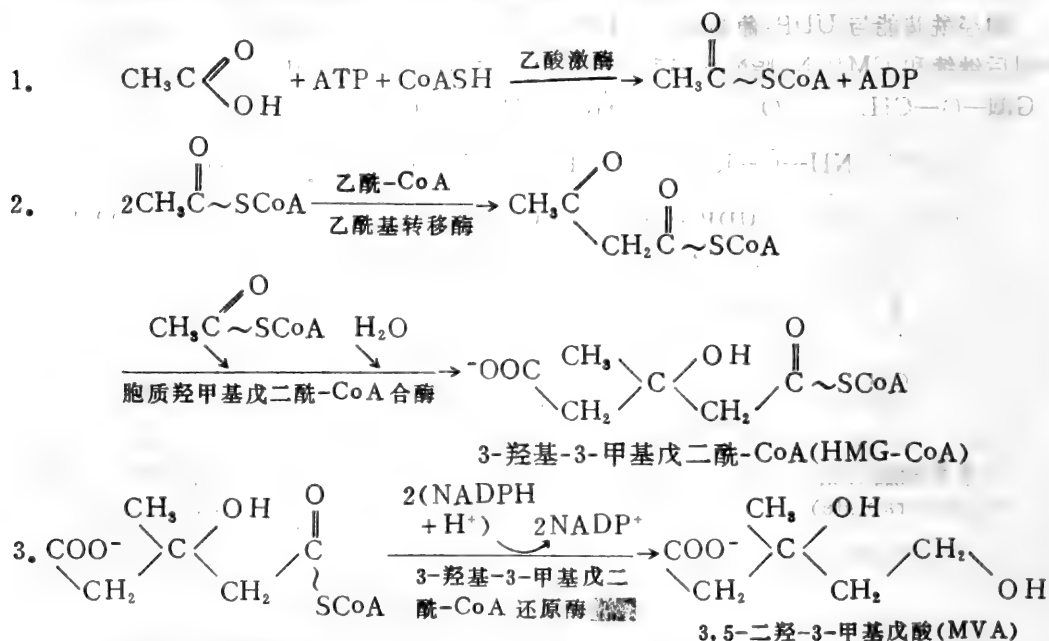
胆固醇存在于所有动物及一些植物组织中，所有动物都能吸收这种固醇类化合物，也能在体内合成这类化合物，其中肝脏可合成80%的胆固醇。大部分的胆固醇都与脂肪以同一途径进入乳糜微粒，经胸导管，再进入血循环，转变成多种物质，主要是转变为胆汁酸及固醇激素。还有一部分不经分解最后随粪便排出。

一、胆固醇的生物合成

同位素示踪实验证明：内源胆固醇的所有碳原子都来自乙酰-CoA。胆固醇合成所包含的酶有些与内质网结合，而有些则是细胞质中的水溶性蛋白。细胞内胆固醇的合成可分为三个主要阶段。

(一) 由乙酸生成3-甲基-3, 5-二羟戊酸 (MVA)

这一阶段需经几个反应步骤和几种不同的酶催化。其顺序如下：

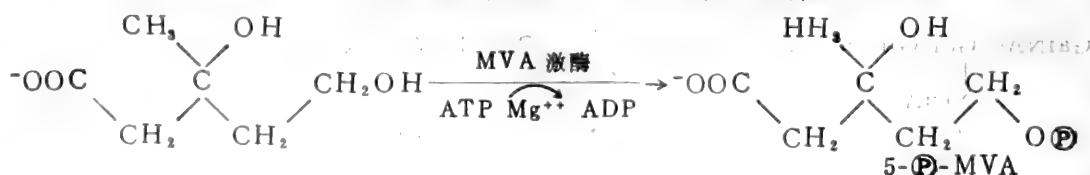


(二) 由 MVA 生成鲨烯

这一阶段是由 MVA 衍生而成的六个五碳衍生物进行缩合反应，生成含三十个原子的鲨烯。反应共分七个步骤，需要许多不同的酶催化，现按顺序介绍如下：

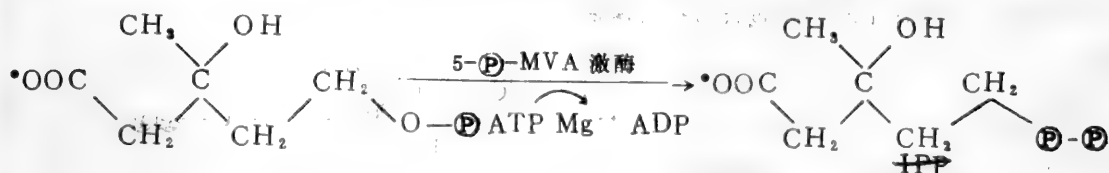
1. MVA 的磷酸化

MVA 在激酶催化下，MVA 的伯醇羟基被 ATP 磷酸化成5-磷酸-MVA。



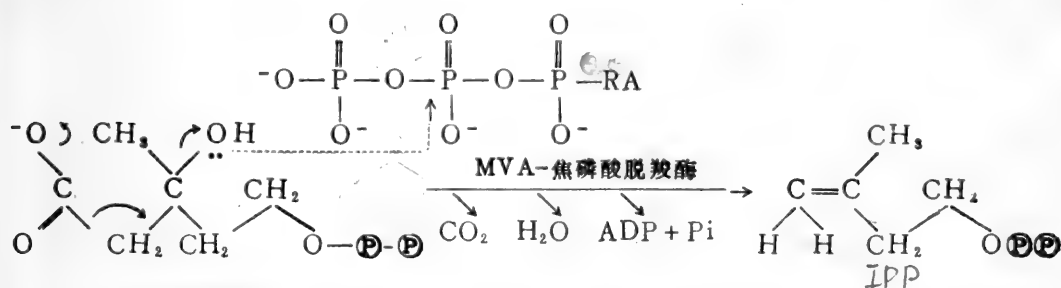
2. 5- P -MVA 的磷酸化

在5- P -MVA 激酶催化下, 5- P -MVA 继续磷酸化, 形成5-焦磷酸-MVA。



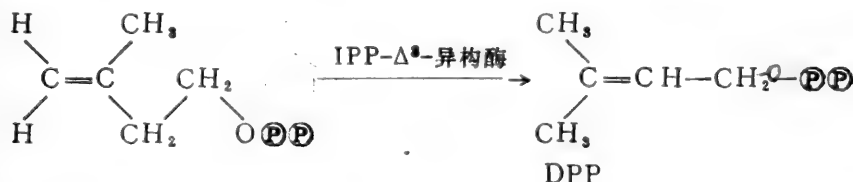
3. Δ^3 -异戊烯基焦磷酸酯的形成

5-焦磷酸 MVA 在 ATP 和 MVA-焦磷酸脱羧酶催化下, 脱羧而成异戊烯基焦磷酸酯 (IPP)。



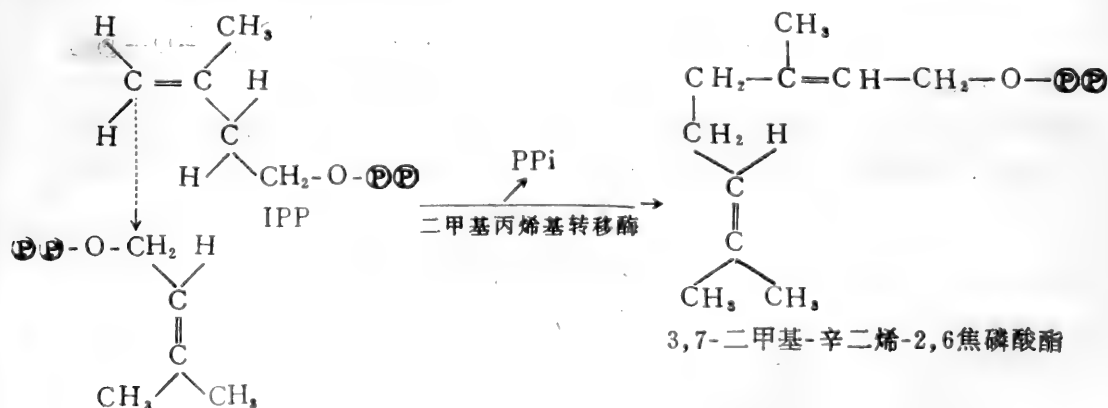
4. IPP 的异构化

在 IPP- Δ^3 -异构酶催化下, IPP 异构化生成二甲基丙烯焦磷酸酯 (DPP)。



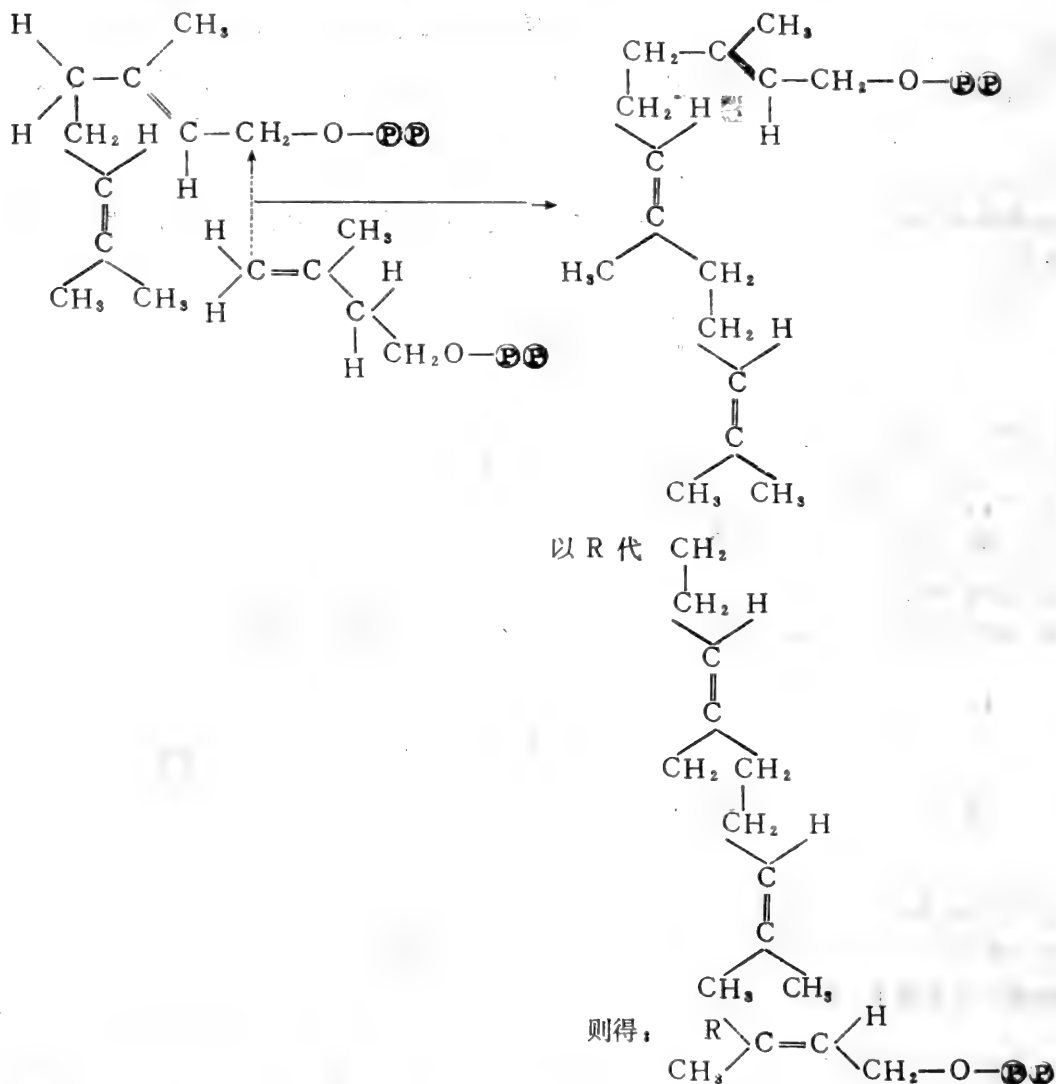
5. DPP 和 IPP 的缩合反应

在二甲基丙烯基转移酶催化下, DPP 和 IPP 头尾缩合而成3,7-二甲基辛二烯-2,6-焦磷酸酯 (又称牻牛儿醇焦磷酸酯)



6. 法尼醇焦磷酸酯的形成

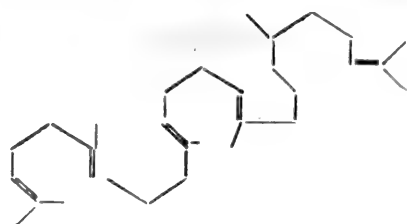
在牻牛儿焦磷酸：异戊烯基焦磷酸牻牛儿基转移酶催化下，牻牛儿醇焦磷酸继续再与一分子 IPP 缩合形成含十五个碳的法尼醇焦磷酸酯。



7. 鲨烯的形成

在法尼醇转移酶催化下，两分子法尼醇头尾缩合成鲨烯，反应过程如图10-9。

故鲨烯可写成下式



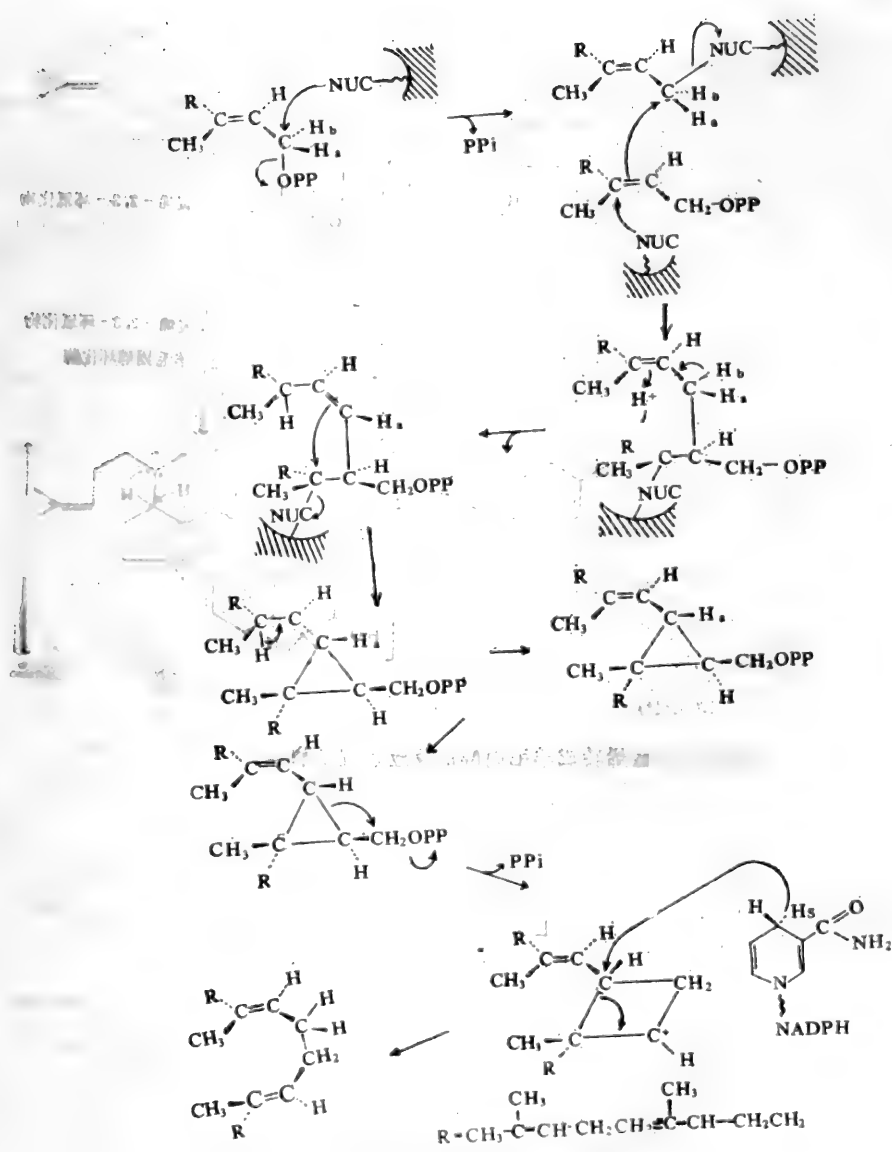


图10-9 两个法尼醇焦磷酸缩合成鲨烯的反应过程

(三)由鲨烯生成胆固醇

鲨烯经加氧、环化、脱甲基、双键移位等过程折叠成胆固醇。反应过程及酶系介绍如下：

1. 鲨烯形成羊毛固醇

在鲨烯单加氧酶（EC、1、14、99、7）催化下，鲨烯被氧化成2,3-环氧化物。如图10-10。

图10-10反应中鲨烯转变成环氧化物的酶又称鲨烯环氧化酶。该酶存在于内质网上，由两个组分构成，一是 NADPH-Cytc 还原酶，二是非血红素铁蛋白，二者都是黄素蛋白，

2. 由羊毛固醇生成胆固醇

羊毛固醇转变成胆固醇要经过加氧、脱甲基、脱饱和、异构化等一系列反应过程，需要多种酶参加，过程如图10-11。

二、胆固醇的分解代谢

胆固醇在活体内可转变成胆汁酸、固醇激素和维生素 D 等。

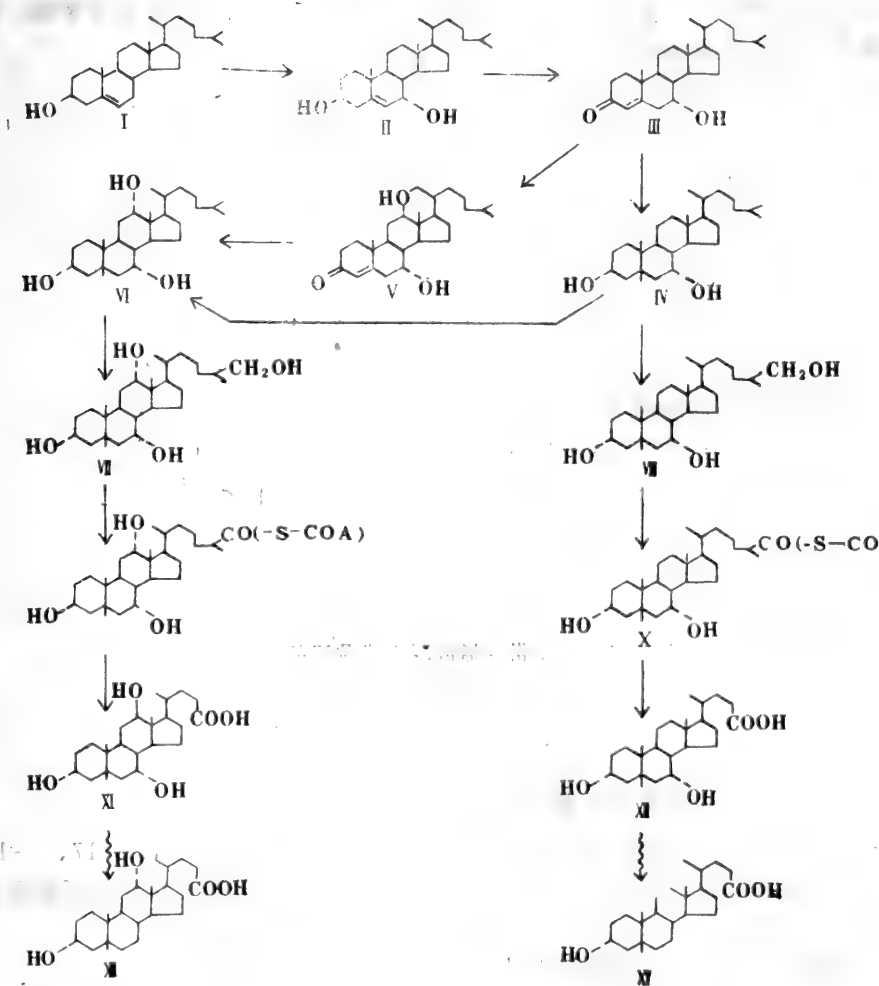


图10-12 胆固醇转变成各种胆汁酸的过程

Ⅰ 为7- α -羟-胆固醇；Ⅱ 为7- α -羟-4-胆固醇-3-酮；Ⅲ 为5 β -胆固醇-3 α , 7 α -二醇；Ⅳ 为7 α , 12 α -二羟-4-胆固醇-3-酮；Ⅴ 5 β -胆固醇-3 α , 7 α , 12 α -三醇；Ⅵ 为5 β -胆固醇-3 α , 7 α , 12 α , 26-四醇；Ⅶ 为5 β -胆固醇-3 α , 7 α , 26-三醇；Ⅷ 为3 α , 7 α , 12 α -三羟-胆固醇酸；Ⅸ 为3 α , 7 α -二羟5 β -胆固醇酸；Ⅹ 为3 α , 12 α -二羟5 β -胆固醇酸；Ⅺ 为鹅脱氧胆酸；Ⅻ 为脱氧胆酸；Ⅼ Ⅳ 为胆石酸。

→ 表示由肝脏酶催化；~> 表示由微生物酶催化。

(一)胆固醇转变成胆汁酸

大约80%的胆固醇在肝脏中转变为胆汁酸。在转变过程中包括类固醇环的羟化(7,12)和侧链的降解等过程。胆固醇转变成各种胆汁酸的反应如图10-12。

(二)胆固醇转变成类固醇激素

胆固醇经孕酮而转变成睾丸酮、雌二醇和肾上腺皮质激素等。

1. 孕酮的合成

胆固醇经一复杂酶系作用,首先在 C_{20} 和 C_{22} 羟化,生成20,22一二羟胆固醇。然后断裂一段侧链,形成孕(甾)烯醇酮。然后再经氧化和双键转移两个步骤形成孕酮。孕(甾)烯醇酮形成孕酮的反应如图10-13。

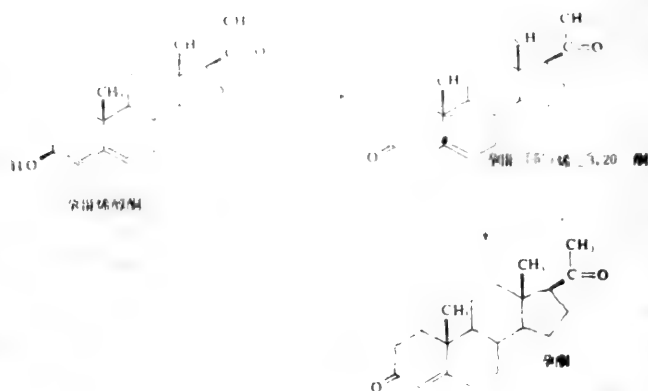


图10-13 孕(甾)烯醇酮生成孕酮的反应

2. 孕酮转变成肾上腺皮质激素

孕酮转变为各种皮质激素一般需要经过羟化反应。羟化可在 $C-11$ 、 $C-17$ 、 $C-18$ 、 $C-21$ 等位上发生。这些羟化反应都由专一性的单加氧酶催化。不同位羟化产生不同的皮质激素。见图10-14。

3. 孕酮转变成各种雄性和雌性激素

孕酮转变成雄激素亦需经羟化、脱支链、脱氢、双键转移等过程。

此外胆固醇能转变为7-脱氢胆固醇,在紫外光照射下也可转变为维生素 D_3 。体内过多的胆固醇,在肠道微生物作用下,转变成其它类固醇,由粪便排出体外。

第八节 脂代谢失常引起的常见病

脂代谢失常可引起一系列病症，上面已介绍的酮尿症、酮血症是其一例。兹再举一些常见疾病如下。

一、脂肪肝

肝脏是脂类代谢的重要场所，肝内正常脂肪含量约为5%，当肝脏脂代谢异常，肝中的载脂蛋白不能及时将脂肪运至肝外组织时，就会造成脂肪在肝中累积，形成脂肪肝。某些脂肪肝患者肝中脂肪含量可达10%。

动物如鼠类喂以缺胆碱和低蛋白食物时，常会产生脂肪肝，这种脂肪肝的形成是由于缺乏胆碱，故不能形成磷脂酰胆碱。如果喂以胆碱或卵磷脂即可防止或治疗脂肪肝。

糖尿病患者体内动用了过多的脂肪，可通过供给胰岛素来控制糖尿病，以防止脂肪肝形成。这种脂肪肝的形成是由于从贮脂过多地转移到肝中而造成。

肝细胞中毒，如氯化的脂肪族或芳香族碳氢化合物是强烈的肝毒剂，可使脂肪在肝中累积。此外肺结核等慢性感染病及早期酒精肝硬变症等患者体内也可看到脂肪肝的形成，这是由于肝细胞损坏，肝功能受损，减少了脂肪的降解造成的。

二、高胆固醇血症

有一种遗传病叫家族高胆固醇血症。患者显示高水平的血浆胆固醇和高水平的低密度脂蛋白。患者的成纤维细胞和其他细胞都缺乏血浆 LDL 受体。等位性遗传缺乏有三种类型：①没有 LDL 的结合；②LDL 的结合大大减少；③有正常的 LDL 的结合但无 LDL 的细胞内向化。因此胆固醇酯难以进入细胞内。胆固醇对 HMG-CoA 还原酶的细胞内反馈作用缺乏，导致肝和其他组织细胞高速合成胆固醇。在杂合子中，每个细胞只有正常细胞一半的 LDL 受体，而在血浆中的 LDL 水平约为正常的2.5倍。纯合子由于缺乏 LDL 受体，血浆中的 LDL 则约为正常的6倍。

这种家族高胆固醇血症杂合子患者在33—55岁间易患动脉硬化（动脉胆固醇斑的沉积）。纯合子患者常在20岁前即死去。除了冠状动脉阻塞外，这两种情况都会显示黄瘤病（黄脂增生），在皮肤、腱鞘和骨中存在多发性黄瘤。黄瘤为 LDL 引入的胆固醇酯的沉积物，常存在于巨噬细胞中。

还有一种 Wolman's 病，患者缺乏溶酶体酯酶。该酶在正常状态，可将经 LDL 受体而引入细胞中，并经内向化的 LDL-胆固醇酯水解。由于缺乏该酶导致胆固醇酯在溶酶中累积而遍及全身。严重时也有三酰甘油累积，这种情况在生命早期即可致死。

三、其它类型的疾病

除了上述两种脂代谢病外，还有多种脂代谢失常病是由于缺乏各种专一性酶而引起的。如泰萨氏幼年型黑朦白痴病是由于脑中缺乏氨基己糖苷 A 酶，以致引起脑中积累神经节苷脂而产生脂代谢失调病，患者失明、脑退化，甚至丧命，又如克腊伯氏病是由于缺乏半乳糖神经酰胺- β -半乳糖基水解酶。而引起半乳糖脑苷脂累积，并几乎缺乏髓磷脂，患者智力迟钝。另外尼曼皮克症是由于缺乏鞘磷脂酶，神经组织鞘磷脂累积。患者精神迟钝。

第十一章 氨基酸代谢

生物体要维持正常的生命活动，保证正常的新陈代谢作用，就必需各种各样的含氮化合物，生命本身就是蛋白质和核酸特定的存在形式。要维持正常的生命还需要各种不同的酶、维生素、激素和受体等。酶和受体是蛋白质，很多辅酶也是含氮化合物，很多维生素是辅酶的成分。一些激素如氨基酸激素、多肽激素、蛋白激素等也都是含氮化合物。生物体内不管那种含氮有机物，它们的形式都离不开氨基酸，生物体必需首先合成或由外源供给氨基酸，才能合成或转变成其它需要的含氮化合物。本章将介绍生物体氨基酸的合成、分解，以及转变成其它含氮化合物的过程和调节等，重点介绍氨基酸的合成和分解。

不管氨基酸的合成还是分解，其氮化物的形式首先必需是 NH_3 ，即氨基酸合成所需的氮源首先必需还原成 NH_3 ，才能用来直接合成氨基酸，氨基酸分解所释放的含氮产物也都是 NH_3 或其衍生物，最后转变为其它含氮有机物。

第一节 合成氨基酸的氮源

合成氨基酸的氮源主要有三方面：一是固氮作用，将 N_2 还原成 NH_3 ；二是由外源硝酸盐在生物体内还原成 NH_3 ；三是由外源供给铵盐，或外源及体内氨基酸分解产生的 NH_3 。

一、生物固氮作用

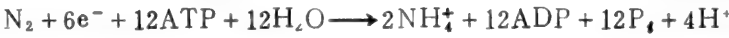
所谓生物固氮作用，即在生物体内由 N_2 还原成 NH_3 的过程。固氮作用只能在某些微生物体内完成，植物自身不能还原 N_2 ，但与微生物共生的植物根瘤中则有 N_2 的还原作用。一般固氮菌属、假杆菌属 (*P. Sordobacter*) 和某些藻类 (如蓝藻) 都能固氮，把氮还原成 NH_3 ，这些微生物称为自生固氮微生物。豆科植物共生的固氮根瘤菌也能把 N_2 还原成 NH_3 ，称共生固氮菌。估计每年约有三千万——六千万吨的空气 N_2 被各种微生物还原成 NH_3 。

生物固氮机制很复杂，至今仍未完全阐明，但某些微生物如巴氏梭状菌和棕色固氮菌中的固氮酶，已被分离、纯化、结晶，并进行了较详尽的研究。

目前已知固氮酶是一个复合物，至少由两种不同蛋白质构成，它们单独存在时都无活性。第一种蛋白质即固氮酶本身，能起固氮作用，其大小因不同来源的微生物而异。它含有四个相同的亚基 ($M \cdot W = 210,000 \sim 240,000 \text{ dt}$)，每个亚基带一个 Mo-Fe 辅酶 (结构尚未弄清楚) 和一个 Fe_4S_4 基团。第二种蛋白质组分为固氮酶还原酶 (nitrogenase reductase)， $M \cdot W$ 约为 $55,000 \sim 60,000 \text{ dt}$ 。它也由两个相等亚基构成，每个亚基含一个 Fe_4S_4 基团。每个固氮酶复合物含有两个固氮酶还原酶和一个固氮酶。固氮所需的还原力一般由 NADPH 提供。 NADPH 的电子经黄素蛋白把铁氧还蛋白 (ferredoxin) 或黄氧还蛋白 (flavodoxin) 还原，旋即使固氮酶复合物中第二种组分还原，然后还原其第一个组份 Mo-Fe ——蛋白，

从而将 N_2 还原成 NH_3 。

在固氮过程中，每转移一对电子，需要四个 ATP 水解供能。所以固氮复合物又显示 ATP——酶活性。此外固氮过程需要 Mg^{++} ，但 Mn^{++} 和 Fe^{+} 也具有这一功能。固氮的总反应式可示如下式



固氮酶也具有氢化酶活性，催化 $2H^+ + 2e^- \longleftrightarrow H_2$ 。有人认为在氢化酶作用下， $H_2 \longrightarrow 2H^+ + 2e^-$ ，这电子可通过铁氧还蛋白转移到固氮酶的铁蛋白组分上。与此同时， Mg -ATP 复合物结合于铁蛋白上，使其构象发生改变，氧化还原电位也发生改变，从而使它能把电子转移给 Mo - Fe 蛋白固氮酶中心，由还原态的 Mo - Fe 蛋白再把电子传给 N_2 使之还原。总反应机制如图11-1。

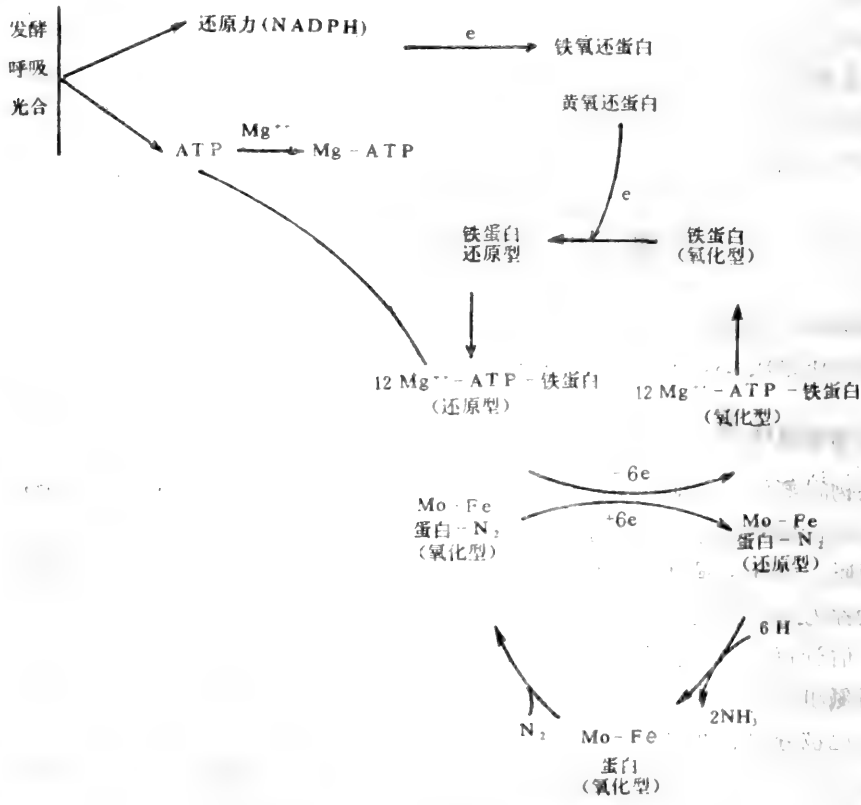


图11-1 固 N_2 的总反应机制

在固氮反应中， N_2 是电子受体，接受电子还原成 NH_3 。目前还没有找到自由的中间产物，但 N_2 还原又似乎是逐步进行的，曾有人假设 $HN=NH$ 和 H_2N-NH_2 为中间产物。固氮酶不仅能使 N_2 还原，也能使 N_2O 、 HN_3 、 HCN 和一些非含氮的含三键的化合物还原，如 $H-C \equiv C-H$ 即可被固氮酶还原成乙烯。这后一反应可用于气相层析法测定固氮酶活性。

固氮酶的两个组分能被 O_2 不可逆地抑制。豆血红蛋白的明显功能是它被运送到豆科植物根瘤的根瘤菌中去与 O_2 结合, 以保持根瘤中的氧压在 0.01mmHg 柱以下。在蓝绿藻中, 则由细胞壁把固氮酶与光合作用释放的 O_2 隔开。

对 *Klebsiella pneumoniae* 突变体的研究, 证明了固氮作用的复杂性。这种微生物为了能在 N_2 中生长, 必需有14个基因群集在一起, 如果这些基因中的任何一个的蛋白质产物缺乏, 则该菌即不能生长。编码 Mo-Fe 蛋白的基因有四个, 有一个基因编码铁蛋白; 另有两个基因的产物为该蛋白活化所必需, 其它基因则编码电子转移所包含的蛋白质。还有一些基因则编码调节固氮过程中所包括的一些蛋白质。

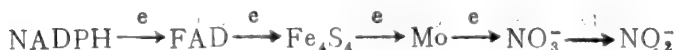
根瘤菌的品种对一种给定的植物是专一的。如紫花苜蓿、大豆、三叶草都有其特有的根瘤菌。细菌和寄主植物间的接触是通过细菌表面多糖和寄主植物凝集素相结合, 首先产生感染细丝, 最后形成根瘤。在根瘤内, 植物细胞被细菌充满, 这些细菌都结合于细胞膜上。豆科植物既供给固氮所需的能量 (ATP, NADPH), 也供给豆血红蛋白, 以保护固氮酶免受 O_2 的毒害。

固氮活性的调节有两种方式。一种是粗调节, 酶的合成可被过量 NH_3 所阻遏; 另一种是细调节, 固氮酶的活性受 ADP 调节。当 ADP 的量增至 ATP 的一倍时, 则固氮酶进一步利用 ATP 的作用完全被抑制。

二、由硝酸盐、亚硝酸盐还原成 NH_3

绝大部分高等植物和各种微生物能通过 两步酶促反应还原硝酸盐成 NH_3 。第一个酶称硝酸盐还原酶, 它催化两个电子还原硝酸盐成亚硝酸盐。在细菌和植物细胞中, NADH 为电子供体; 在真菌中 NADPH 为电子供体。在真菌和绿藻中的硝酸盐还原酶为黄素蛋白。

硝酸盐还原酶 ($M \cdot W = 800,000$) 是一个四聚体蛋白, 每个单体由 $M \cdot W = 150,000$ 和 $M \cdot W = 50,000$ 两个亚基构成。该酶每个基本二聚单体亚基有一个含 Mo—原子的辅酶, 它含一个 FAD 和几个 Fe_4S_4 组分。其电子传递途径似乎如下式。



所催化的反应可写成:



在这个反应中, M^{+} 接受电子变为 M^{0} , 然后把 e^- 传给 NO_3^- , 自己又氧化成 M^{+} 。

第二个酶是亚硝酸还原酶, 它催化 6 个 e^- 还原 NO_2^- 成 NH_3 , 以 NADPH 作为还原剂。链孢霉菌属的亚硝酸还原酶含有 FAD 和 Siroheme 作为辅基。在菠菜的亚硝酸还原酶中存在一个 Fe_2S_2 中心, 总反应为:



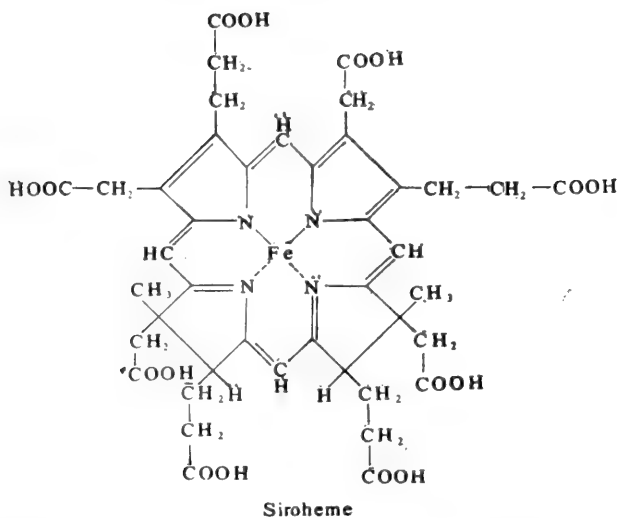


图11-2 Siroheme 的结构

Siroheme 是 NO_2^- 的结合部位，在 NH_3 出现前，没有中间产物解离出来。Siroheme 结构如图11-2

在植物和藻类中，亚硝酸还原酶的直接还原剂是铁氧还蛋白。在绿色植物中，在一黄素蛋白酶——铁氧还蛋白——NADPH 氧化还原酶存在下，它能在光合作用中被还原或被 NADPH 还原。因此铁硫蛋白——铁氧还蛋白，可作为电子供体，把电子给予亚硝酸还原酶中的铁硫基团，然后电子经 Siroheme 转移到 NO_2^- 上。一

些真菌的亚硝酸还原酶含有一个结合态的黄素蛋白，以加速 NADPH 对 Siroheme 的还原。

三、由体内有机含氮化合物分解而得

在生物体内，谷酰胺和门冬酰胺是 NH_3 的主要贮存形式，可在体内酰胺酶的催化下水解释放出 NH_3 ，供给合成蛋白质需用的氮源。生物体内各种氨基酸经各种脱氨方式（见氨基酸的分解代谢）脱下的 NH_3 ，也可作为合成体内所需氨基酸的氮源。此外核酸或核苷酸等分解代谢（见核苷酸代谢一章）的产物，亦可继续分解产生 NH_3 ，作为体内合成某氨基酸的氮源。

第二节 氨基酸生物合成的碳源

氨基酸生物合成最直接的碳源是酮酸，在少数情况下，烯酸也可作为直接碳源。由于氨基酸有二十种，所以形成相应氨基酸的酮酸也各不相同，它们的形成过程，也各有不同途径。下面介绍在生物体内各种 α -酮酸的形成过程。

一、糖酵解及三羧酸循环中所产生的各种酮酸

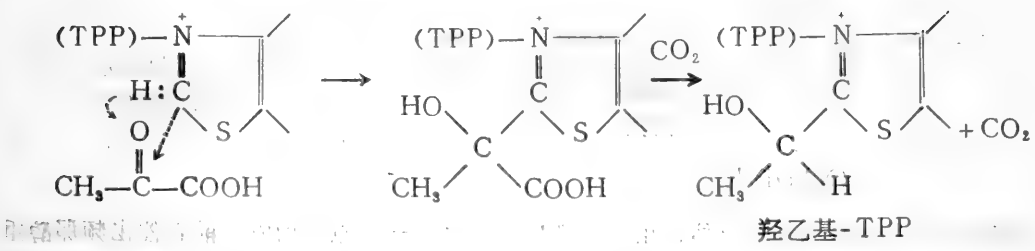
糖酵解产生丙酮酸，丙酮酸经苹果酸酶、丙酮酸羧化酶等催化产生草酰乙酸。丙酮酸经三羧酸循环也可生成 α -酮戊二酸（见糖代谢各章节）。丙酮酸、草酰乙酸、 α -酮戊二酸是丙氨酸、门冬氨酸和谷氨酸的碳源。同时这些酮酸又是体内合成其它酮酸的原料。

二、合成亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸的三种酮酸

这三种酮酸形成过程有许多共同步骤，现介绍如下。

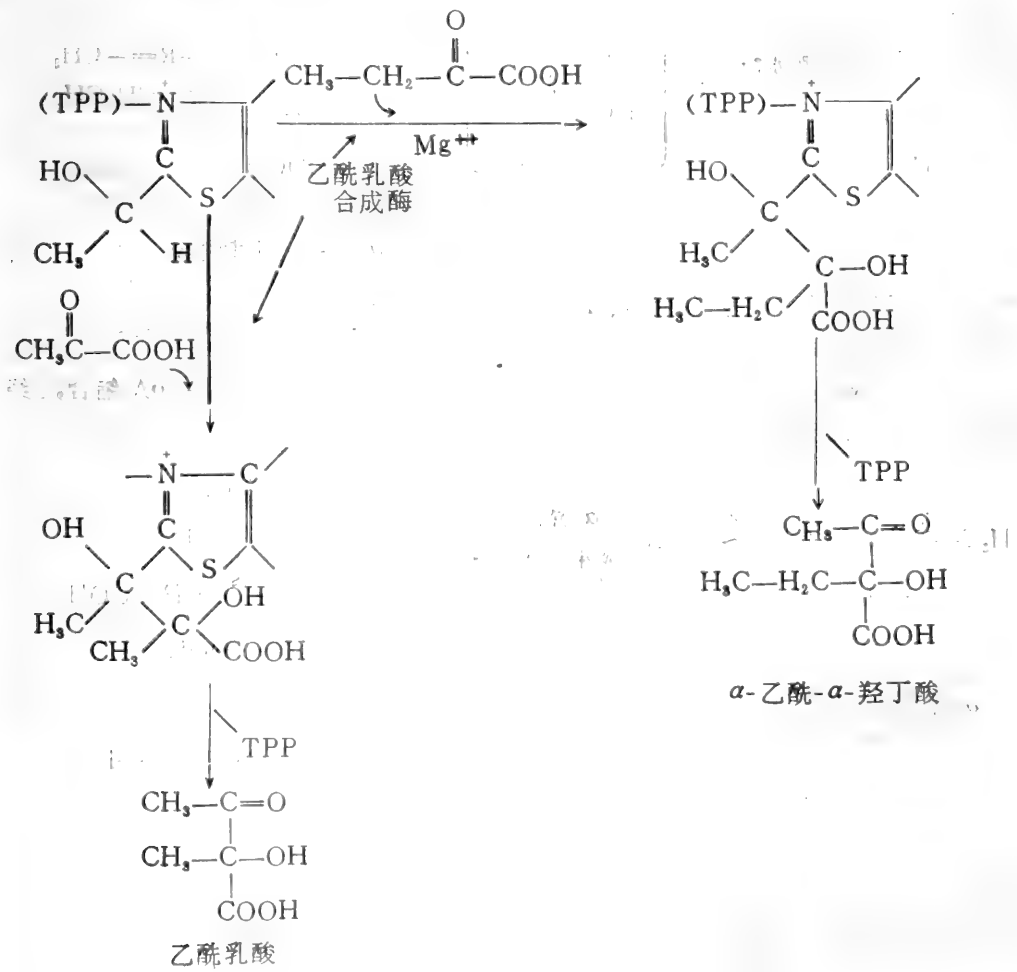
(一) 三种酮酸共同的起步反应——羟乙基-TPP 的形成。

反应如下式（这一反应由丙酮酸脱氢酶复合物催化）：



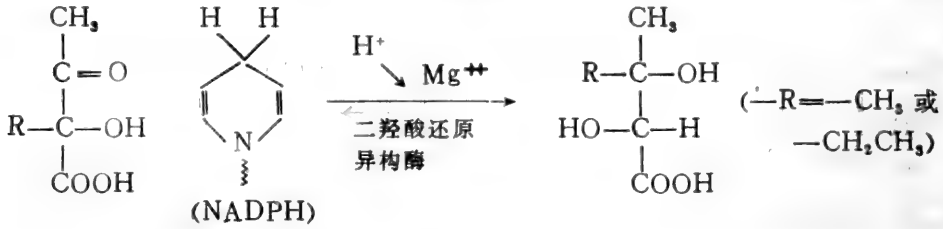
(二) 乙酰乳酸和 α -乙酰- α -羟丁酸的合成

羟乙基-TPP 在乙酰乳酸合成酶催化下可进一步与丙酮酸或 α -丁酮酸（它来自苏氨酸）反应成为乙酰乳酸或 α -乙酰- α -羟丁酸。如下式。



(三) 乙酰乳酸或 α -乙酰- α -羟丁酸的还原异构化

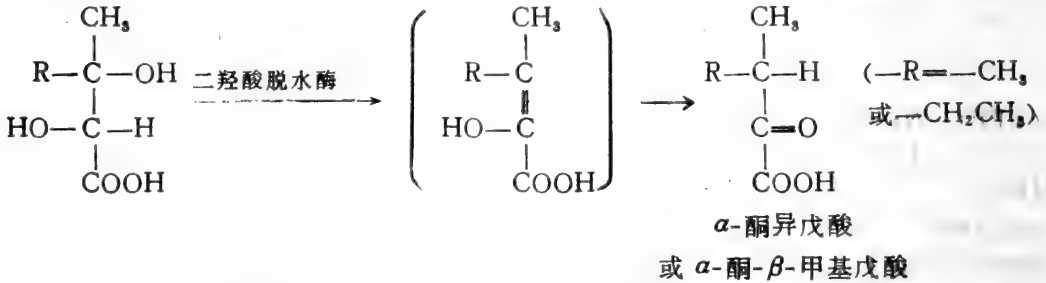
在二羟酸还原异构酶催化下，上述两种酮酸经还原异构化作用而成二羟酸。如下式。



二羟酸还原异构酶为一复合体，由乙酰乳酸变位酶和一还原酶构成。前者催化频那醇重排反应，使 α -乙酰乳酸或 α -乙酰- α -羟丁酸转变为 α -酮- β -羟酸，再经还原酶催化还原为 α, β -二羟酸。该酶为四聚体，它催化 α -乙酰- α -羟丁酸的反应比催化乙酰乳酸快四倍。

(四) α -酮酸的形成

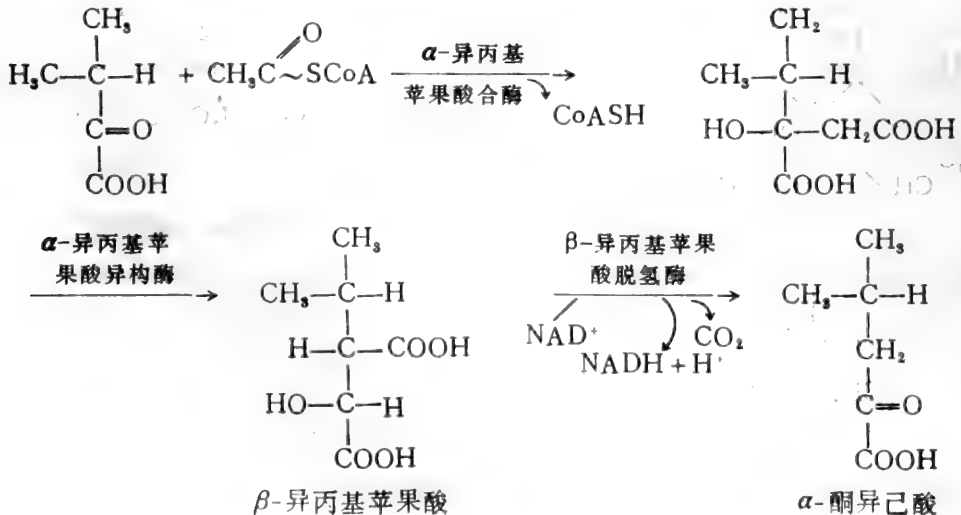
在二羟酸脱水酶催化下，上述两种二羟酸脱水，重排成相应的 α -酮酸。



生成的这两种酮酸可作为合成缬氨酸和异亮氨酸的直接碳源。

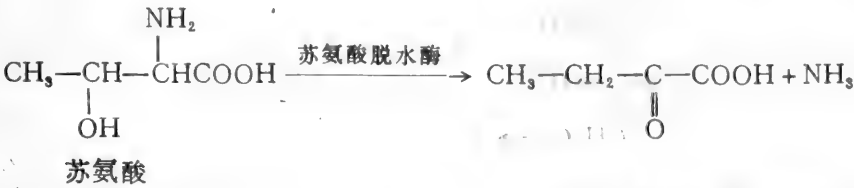
(五) α -酮异己酸的合成

上述 α -酮异戊酸除作为合成缬氨酸的直接碳源外，还可继续与乙酰-CoA 缩合，经一系列反应合成 α -酮己酸。



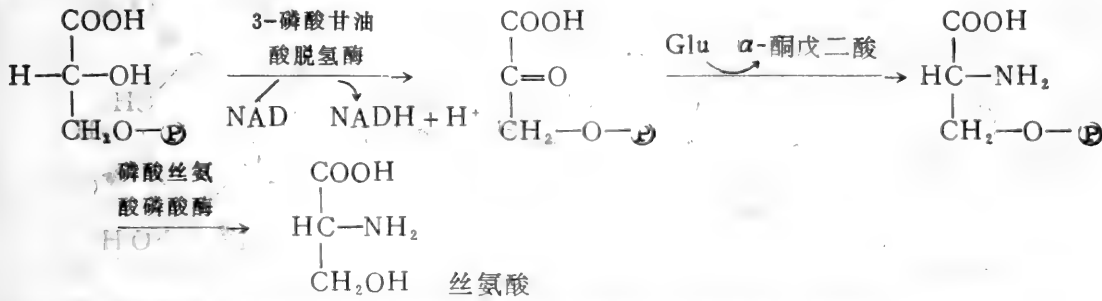
在 α -酮异己酸由 α -酮异戊酸的形成过程中，其中的一系列反应类似于三羧酸循环 中草 酰酸与乙酰-CoA 缩合而形成 α -酮戊二酸的过程（见第九章）。 α -酮异己酸 是合成 亮氨酸 的直接碳源。

在 α -酮- β -甲基戊酸合成中，需要一个 α -酮丁酸。此酸可来自苏氨酸的脱氨反应（脱 水脱氨）。



三、合成丝氨酸的直接碳源

在糖酵解过程中产生的 3-磷酸甘油酸，在 3-磷酸甘油酸脱氢酶催化下，可形成 3-磷酸 羟基丙酮酸，该产物可作为合成丝氨酸的直接碳源。先经转氨合成磷酸丝氨酸，再在磷酸酶 催化下即得到丝氨酸。

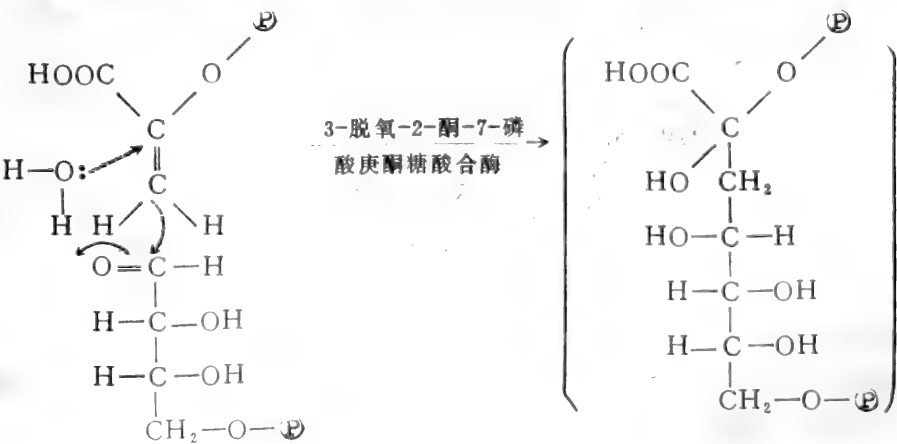


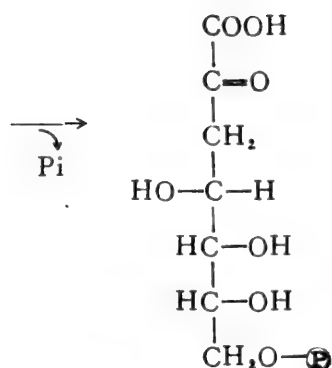
四、合成苯丙氨酸和酪氨酸的碳源——苯丙酮酸和对羟基苯丙酮酸的合成

这两个酮酸的合成过程较复杂，需经一系列反应。

(一) 4-磷酸赤藓糖和磷酸烯醇式丙酮酸的缩合反应

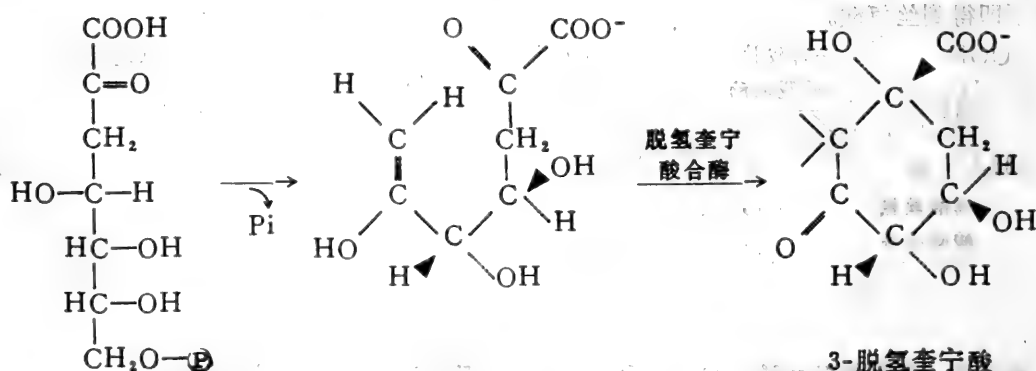
这一反应为两种酮酸的芳香环提供碳原子。在 3-脱氧-2-酮-7-磷酸庚酮糖酸合 酶 催化 下，4-磷酸赤藓糖和磷酸烯醇式丙酮酸缩合成 3-脱氧-2-酮-7-磷酸庚酮糖酸。





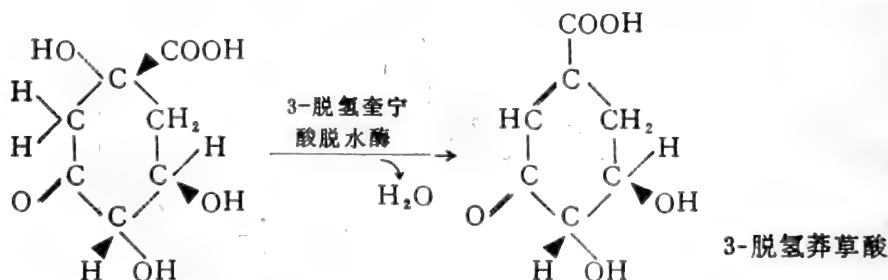
(二)3-脱氧-2-酮-7-磷酸庚酮糖酸的环化

在脱氢奎宁酸合酶的催化下，3-脱氧-2-酮-7-磷酸庚酮糖酸脱磷酸环化成3-脱氢奎宁酸。



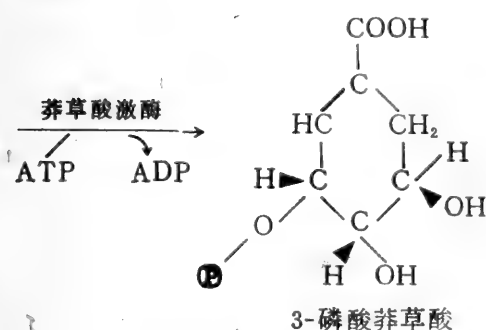
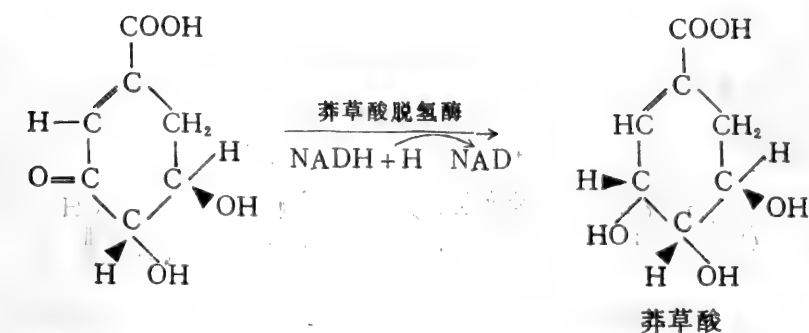
(三)3-脱氢莽草酸的形成

在3-脱氢奎宁酸脱水酶催化下，3-脱氢奎宁酸脱水形成3-脱氢莽草酸（3-dehydroshikimic acid）。



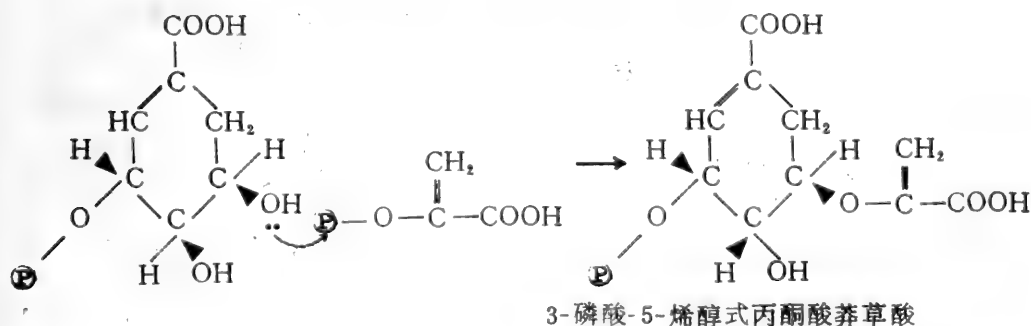
(四)莽草酸的形成及磷酸化

在莽草酸脱氢酶催化下，3-脱氢莽草酸的酮基被还原而成为莽草酸，然后再在3-位羟基上磷酸化而成3-磷酸莽草酸。



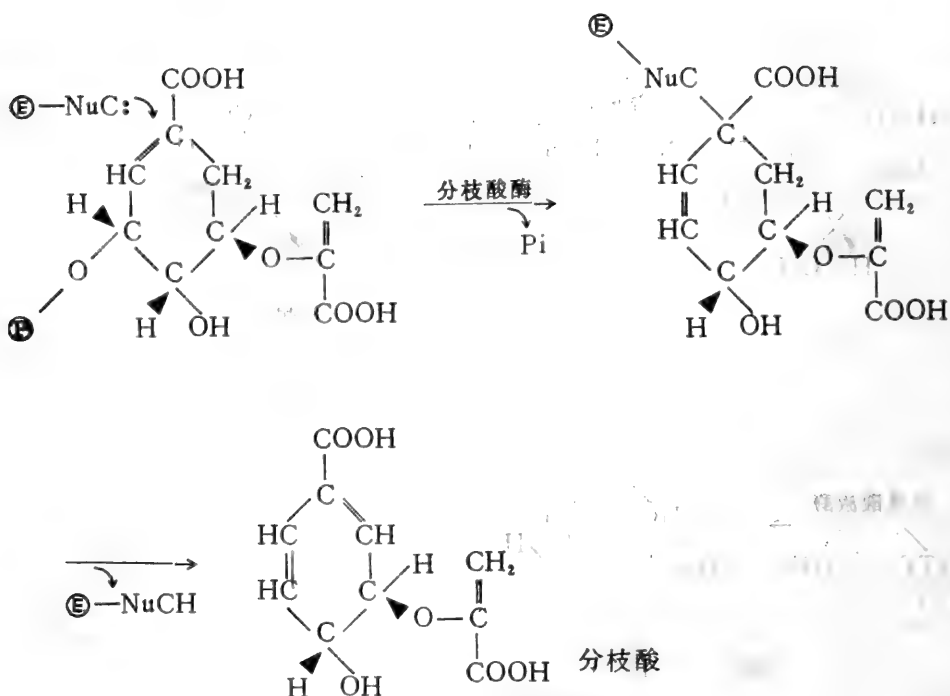
(五) 3-磷酸-5-烯醇式丙酮酸莽草酸的形成

在3-磷酸-5-烯醇式丙酮酸莽草酸合酶催化下，3-磷酸莽草酸的5-位羟基与磷酸烯醇式丙酮酸脱磷酸缩合，产物即为3-磷酸-5-烯醇式丙酮酸莽草酸。



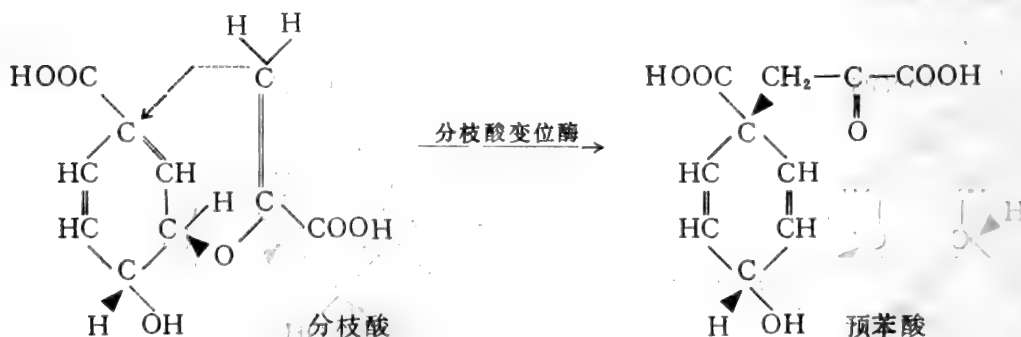
(六) 分枝酸的形式

在分枝酸合酶 (chorismate synthase) 催化下，首先由酶上的一个亲核基团攻击3-磷酸-5-烯醇式丙酮酸莽草酸的 C-1，使双键移位，使3-位脱磷酸。然后酶的亲核基团带着其相邻碳上的一个 H⁺ 离去，又形成一个双键，成为分枝酸。



(七)分枝酸重排成预苯酸 (prophenic acid)

在分枝酸变位酶 (chorismate mutase) 催化下, 分枝酸重排形成预苯酸。



(八)预苯酸的芳环化

预苯酸可经两条途径芳环化, 在预苯酸脱水酶催化下, 环上的 C-1 脱去 COOH , 双键移位, 使环上 4-位 OH 消去, 形成芳环, 生成苯丙酮酸。在预苯酸脱氢酶催化下, 预苯酸脱羧, 使环 4-位上消去一个 H , 形成对羟基丙酮酸。苯丙酮酸是苯丙氨酸的直接碳源, 对羟基苯丙酮酸则作为酪氨酸的直接碳源。如下图所示。

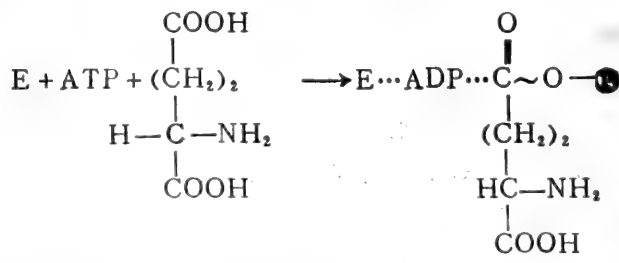
亚基含452个氨基酸残基，与脊椎动物酶有若干同源性。当培养介质中加入谷氨酸后，该酶即因受阻遏而消失。这时介质中出现另一种 NAD⁺ 专一的谷氨酸脱氢酶来取代它。此 NAD⁺ 专一的酶可催化逆反应，使谷氨酸氧化成 α -酮戊二酸。这个 NAD⁺ 专一的酶不同于 NADPH——专一的酶，它只含有四个相同亚基，专门使谷氨酸氧化，并伴有 NADH 生成，通过氧化磷酸化，为菌体提供能量。这种菌类就这样通过调节这两种谷氨酸脱氢酶，来调节谷氨酸的合成。有些高等植物也有类似的两种谷氨酸脱氢酶。

谷氨酸是生物体内其它氨基酸或其它含氮化合物合成的主要的直接的氮源。谷氨酸的氨基可直接转移到各种酮酸上形成相应氨基酸。谷氨酸也可继续与另一 NH₃ 分子反应生成酰胺。酰胺氮也是生物体内许多化合物的直接氮源。

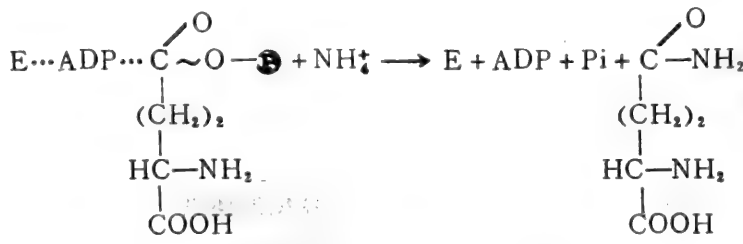
二、谷氨酸加 NH₃ 合成谷酰胺

谷酰胺在生物体内的氮代谢中占有中心位置，它不仅本身是建造蛋白质的基本材料，也是与 α -酮戊二酸反应重新合成谷氨酸的氮源，从而间接作为其它氨基酸的氮源。在其它含氮化合物合成中，它也是常用的氮源（见核苷酸代谢等）。

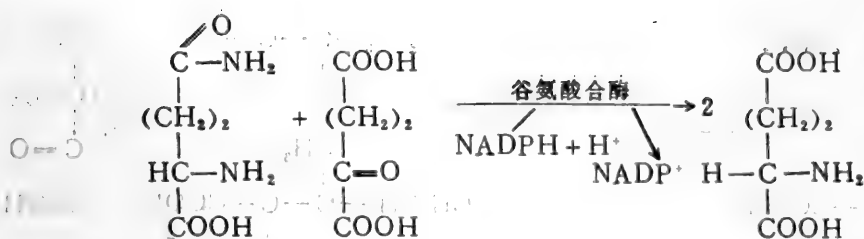
合成谷酰胺的酶为谷酰胺合成酶，以 ATP 为能源。大肠杆菌的谷酰胺合成酶（Glutamine Synthetase）含12个亚基，M·W = 600,000dt；在哺乳动物的肝和脑中的谷酰胺合成酶，M·W = 350,000dt。谷氨酸与 NH₃ 的反应分两步进行，首先是谷氨酸与 ATP 反应形成一活化的与酶结合的中间物——ADP- γ -谷氨酰磷酸。



然后这个活化中间物与 NH₄⁺ 反应，形成谷酰胺、ADP 和 Pi。

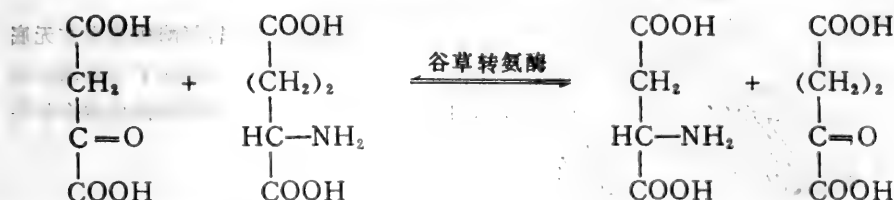


谷酰胺再与 α -酮戊二酸反应，谷酰胺的酰胺氮作为氮源转移到 α -酮戊二酸上，从而形成两个谷氨酸。催化这一反应的酶称为谷氨酸合酶（Glutamic Synthase），它以 NADPH 为辅酶，反应如下：

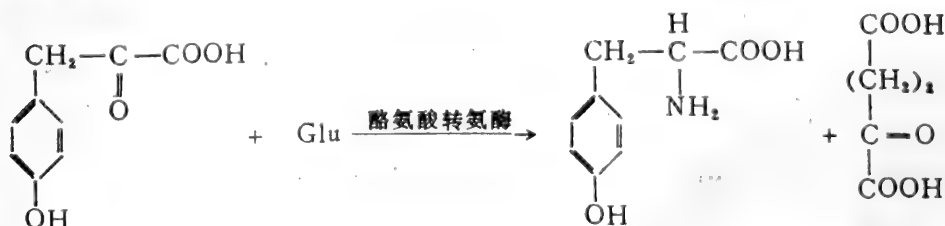
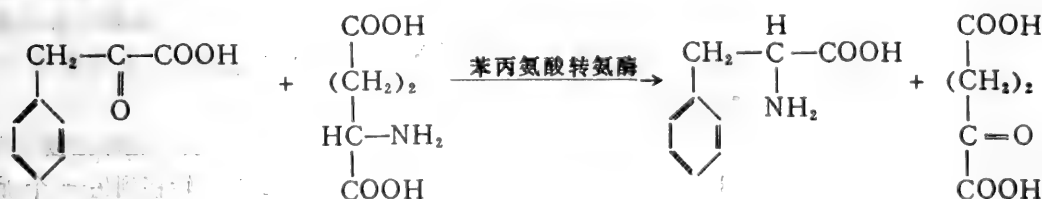


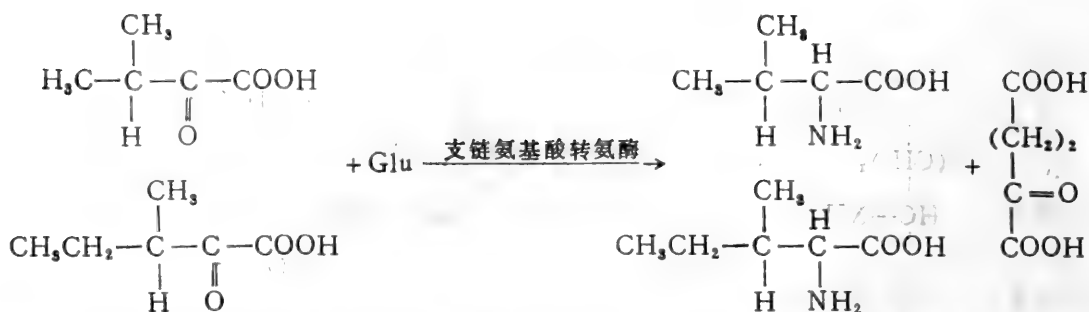
三、转氨作用合成氨基酸

从上述一些酮酸和谷氨酸反应可知：谷氨酸的 NH_2 可转移到酮酸的酮基上形成相应的氨基酸和 α -酮戊二酸。催化这个反应的酶称为转氨酶。所有的转氨反应都以谷氨酸为 $-\text{NH}_2$ 供体。除苏氨酸和赖氨酸外，所有氨基酸都可通过这一途径合成。例如：



由于都是以谷氨酸作 $-\text{NH}_2$ 供体，所以这些转氨酶又常以生成的氨基酸产物命名，如下面几例：





转氨酶的辅基为5-磷酸吡哆醛。在底物不存在时，5-磷酸吡哆醛的醛基与酶蛋白的某赖氨酸的 ϵ -NH₂，共价结合成 Schiff's 碱形式。如图11-3。

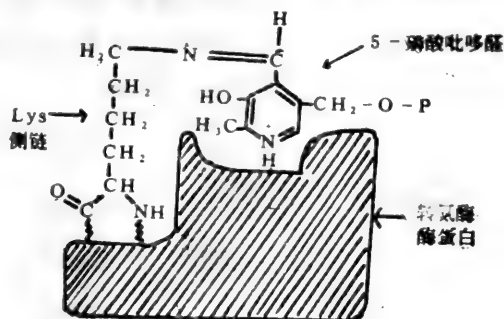


图11-3 转氨酶蛋白在无底物存在下与辅基5-磷酸吡哆醛的结合状态

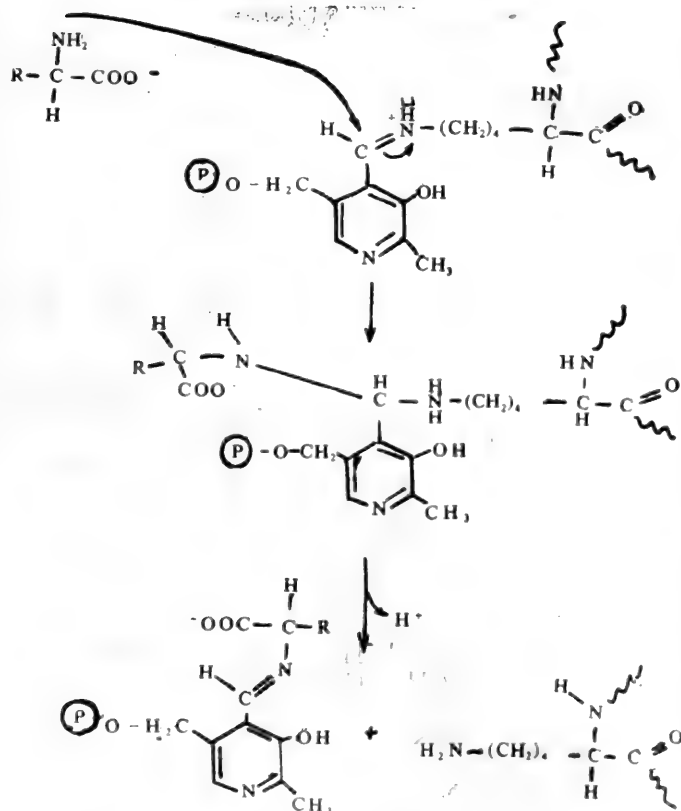


图11-4 转氨酶与底物氨基酸的反应

转氨酶进行催化反应时，首先是底物的一NH₂ 氮亲核攻击 Schiff's 碱的原醛基碳原子，从而代替酶上的赖氨酸 ϵ -NH₂ 与5-磷酸吡哆醛结合形成底物与酶辅基间的 Schiff's 碱。如图11-4。

随后，底物的-NH₂ 即转移到酶辅基上形成磷酸吡哆胺，而底物氨基酸即成为酮酸。如底物氨基酸为谷氨酸，则转变为 α -酮戊二酸。

磷酸吡哆胺酶随即把接受来的一NH₂ 重新转移到另一个底物酮酸上形成新的氨基酸，而酶则恢复原来的吡哆醛形式，并与酶蛋白的某赖氨酸形成 Schiff's 碱。整个转氨机制示如图11-5。

转氨酶对催化谷氨酸转变成 α -酮戊二酸是专一的，但对其它氨基酸及相应酮酸之间转变的

专一性则不强。在微生物中可能存在多专一性的转氨酶，大肠杆菌中已经纯化获得两种转氨酶，一种转氨酶虽亦能利用芳香族氨基酸，但它首先利用门冬氨酸；另一种是芳香族氨基酸转

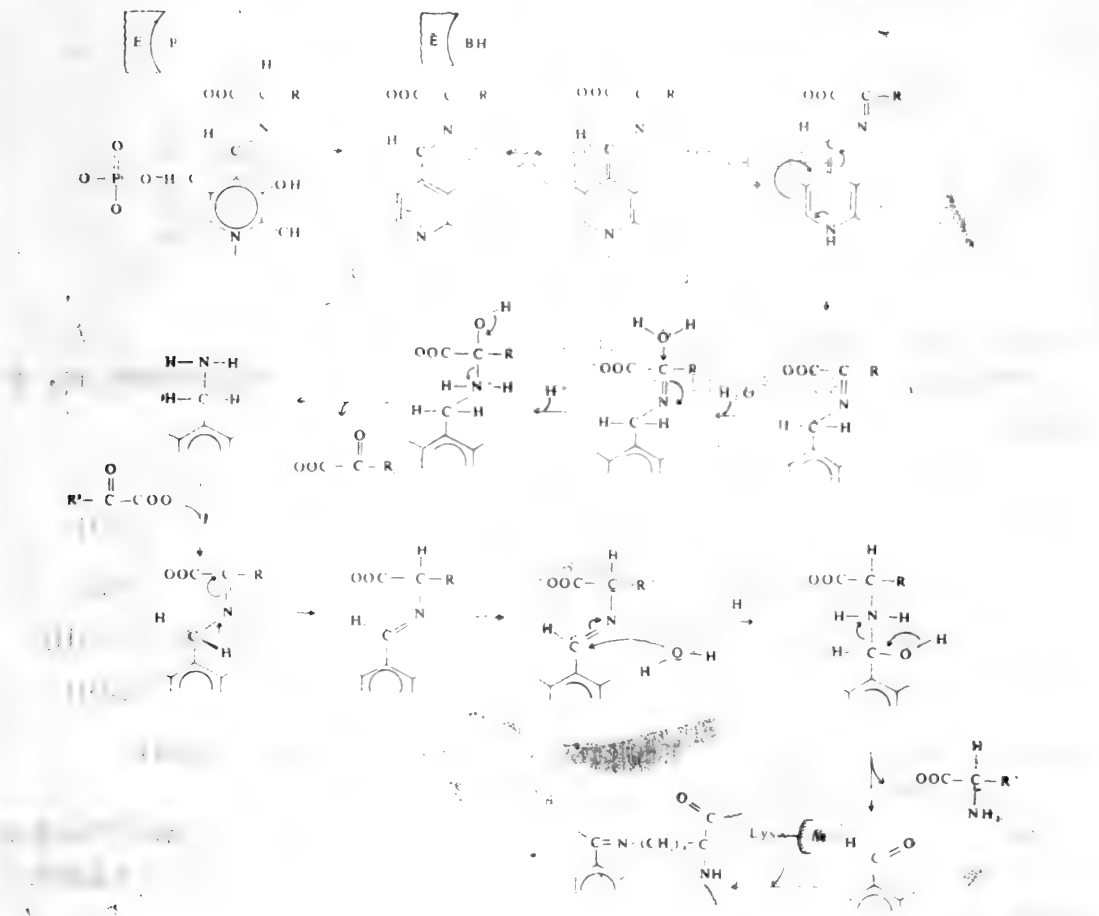


图11-5 转氨酶催化机制图

氨酶。这两种转氨酶在最适 pH 以及稳定温度下对其公共底物和磷酸吡哆醛的 V_{max} 和 K_m 完全不同。有关植物组织转氨酶的知识了解很有限，两种最活泼的转氨反应在 α-酮戊二酸和门冬氨酸或丙氨酸间发生。动物体内谷丙转氨酶和谷草转氨酶分布得广，活性最高。前者主要存在于肝脏中，后者主要存在于心肌中，因此医药上可通过血液中这两种酶的活力测定而推断肝或心脏是否患病。

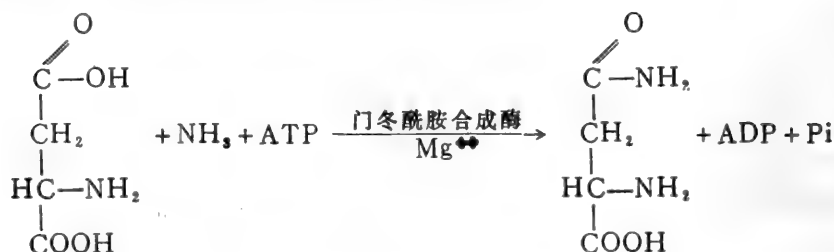
第四节 氨基酸之间的转变

一、由门冬氨酸转变成其它氨基酸

门冬氨酸除可直接加 NH₃ 或转氨合成门冬酰胺外，还可经不同途径合成其它氨基酸，如苏氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸等。

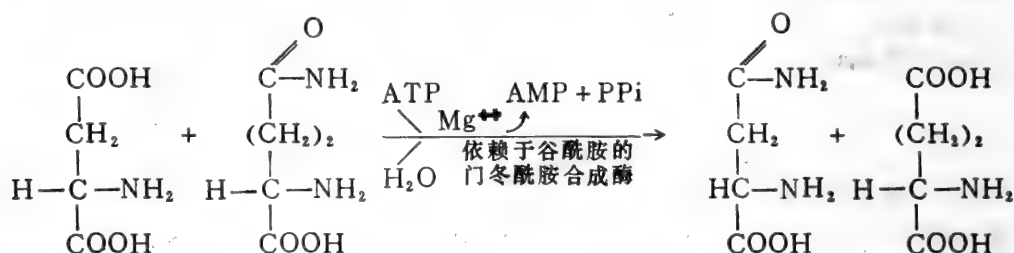
(一) 由门冬氨酸合成门冬酰胺

门冬氨酸在门冬酰胺合成酶催化下合成门冬酰胺。



在微生物和植物体内通常以这种方式合成门冬酰胺。

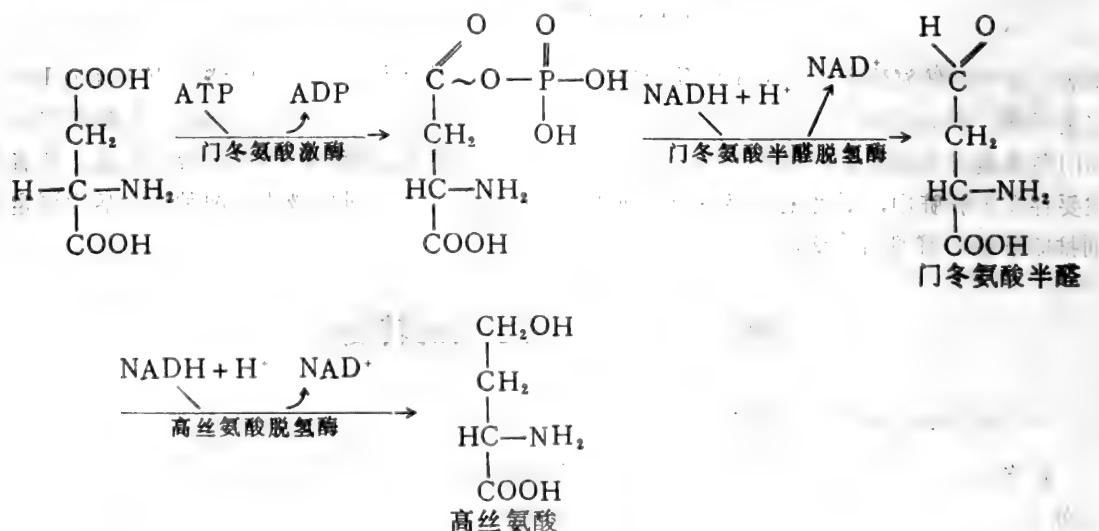
门冬酰胺也能在哺乳动物体内合成，那是由依赖于谷酰胺的门冬酰胺合成酶催化的，反应如下：



参与上述反应的酶实际上属谷酰胺转酰胺酶类，所以谷酰胺不能用 NH_3 来代替。

(二) 由门冬氨酸合成苏氨酸、赖氨酸和甲硫氨酸

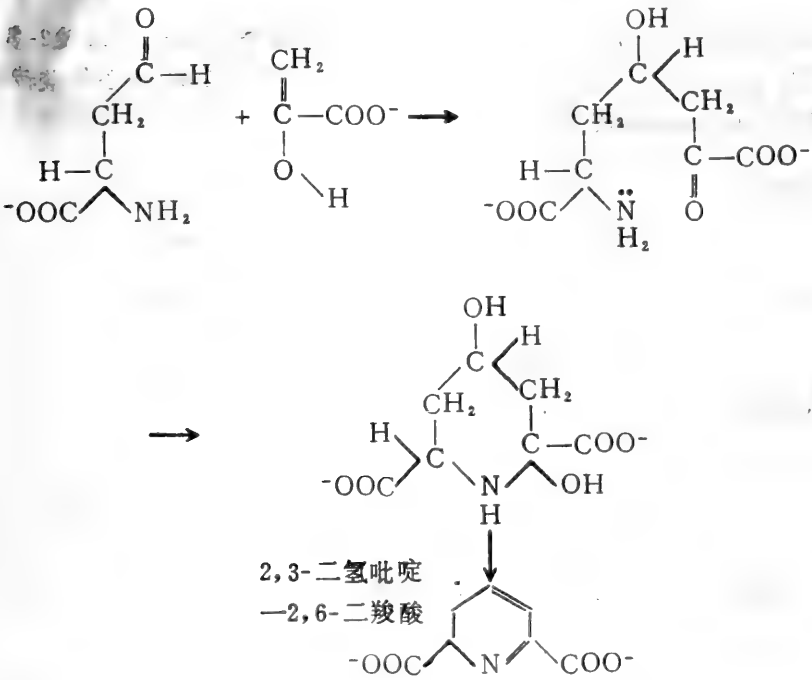
在动物体内不能从门冬氨酸合成这三种氨基酸，而在植物及大多数微生物则可沿此途径合成这三种动物的必需氨基酸。三种氨基酸合成的头几个步骤是共同的。即由门冬氨酸经门冬酰胺磷酸、门冬氨酸半醛形成高丝氨酸。所需的酶及反应如下式：



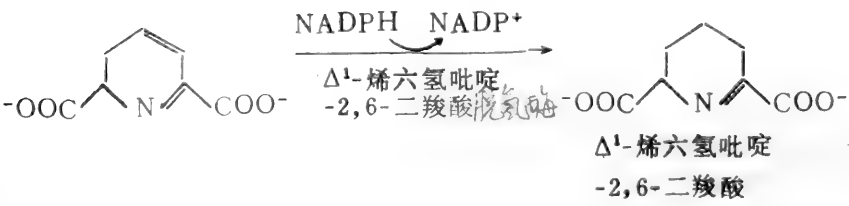
在这一共同反应中，门冬氨酸半醛可作为赖氨酸合成的前体，而高丝氨酸则作为合成苏氨酸和甲硫氨酸的前体。反应中的门冬氨酸激酶，在大肠杆菌中有三种，性质完全不同。门冬氨酸激酶Ⅰ受苏氨酸反馈抑制，门冬氨酸激酶Ⅱ可被甲硫氨酸阻遏，门冬氨酸激酶Ⅲ则可被赖氨酸抑制。从而调节三种氨基酸的合成。

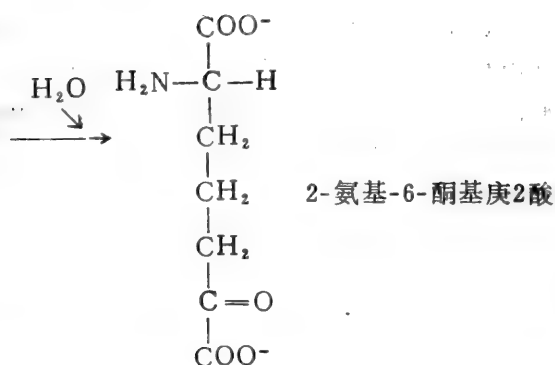
1. 由门冬氨酸半醛合成赖氨酸
合成成分H₂N-进行。

①在二氢吡啶二羧酸合酶催化下，门冬氨酸半醛与丙酮酸缩合合成二氢吡啶二羧酸。

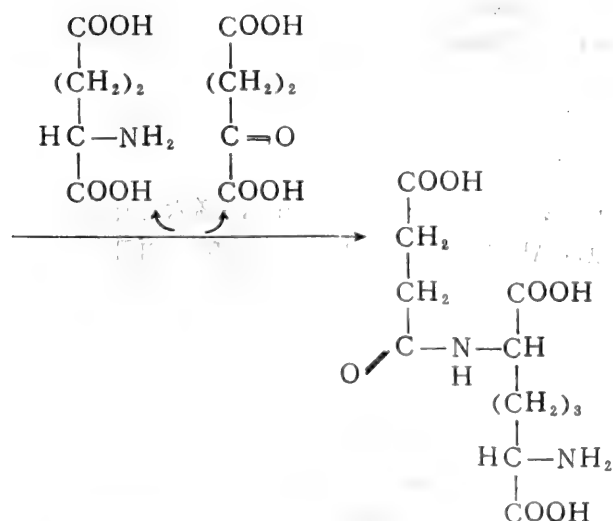
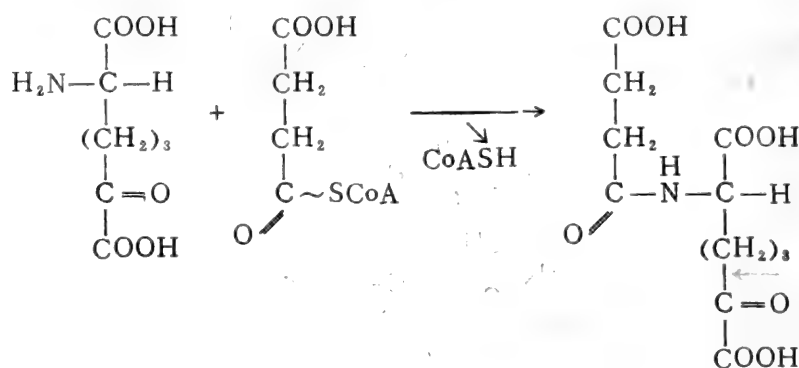


②由二氢吡啶二羧酸合成2-氨基-6-酮基庚二酸。在 Δ^1 -烯六氢吡啶-2,6-二羧酸脱氢酶催化下，二氢吡啶二羧酸还原成 Δ^1 -烯六氢吡啶-2,6-二羧酸，再开环形成2-氨基-6-酮基庚二酸。



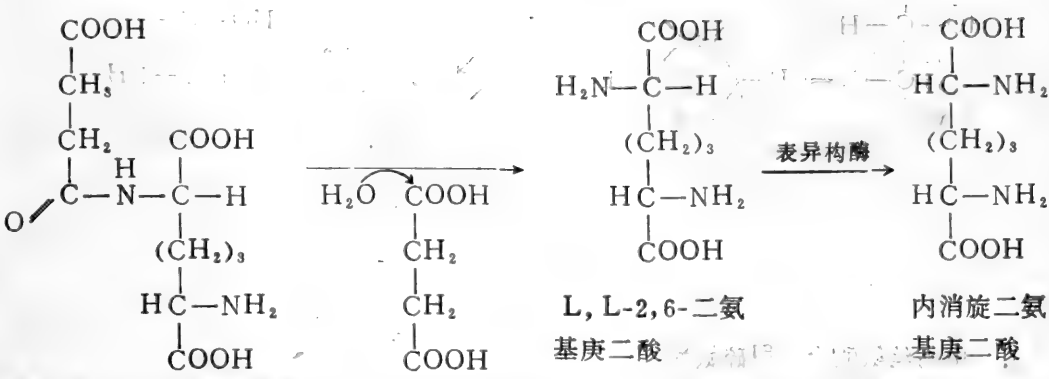


③2-氨基-6-酮基庚二酸的琥珀酰化和转氨反应，首先是由琥珀酰—CoA 使2-氨基-6-酮基庚二酸的一NH₂ 琥珀酰化，然后再在 N—琥珀酰—氨基庚二酸——谷氨酸转氨酶催化下形成 N—琥珀酰—L, L-2, 6-庚二酸。

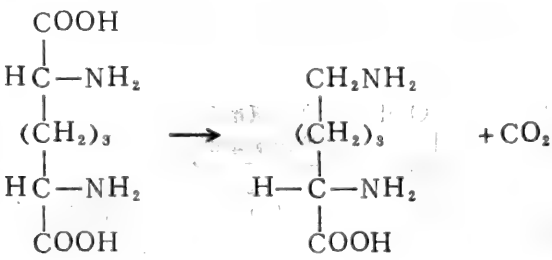


④L, L-2, 6-二氨基庚二酸的形成及其内消旋化。在 N—琥珀酰二氨基庚二酸脱琥珀酰酶催化下，琥珀酰胺键水解形成 L, L-2, 6-二氨基庚二酸，再经表面异构酶催化形成内消

旋-2,6-二氨基庚二酸。

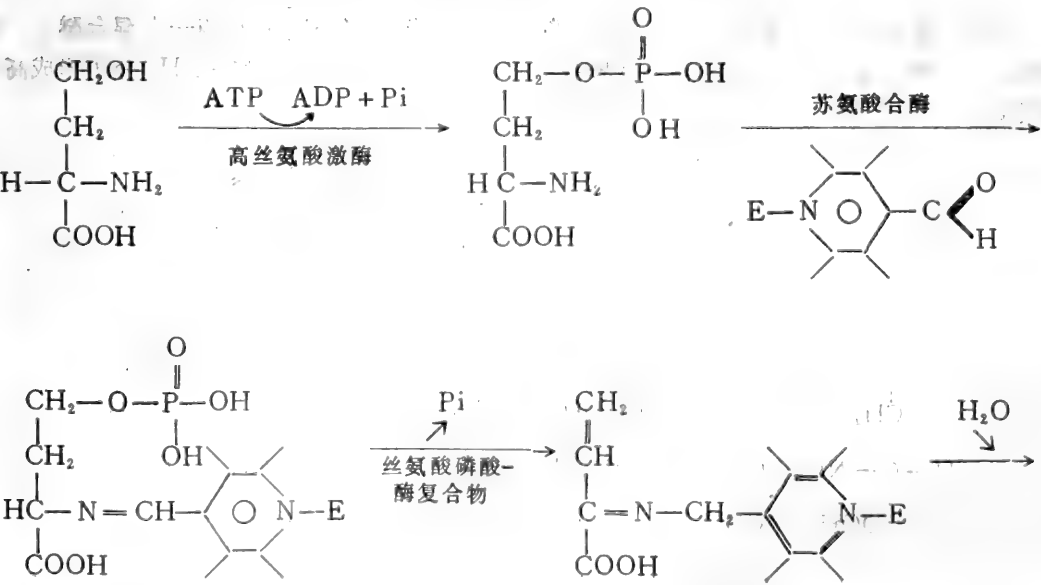


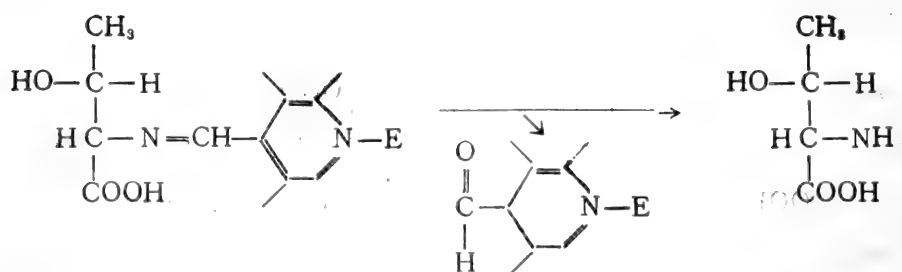
⑤赖氨酸的形成。在二氨基庚二酸 脱羧酶催化下， 内消旋二氨基庚二 酸脱羧形成赖氨酸。



2. 由高丝氨酸合成苏氨酸

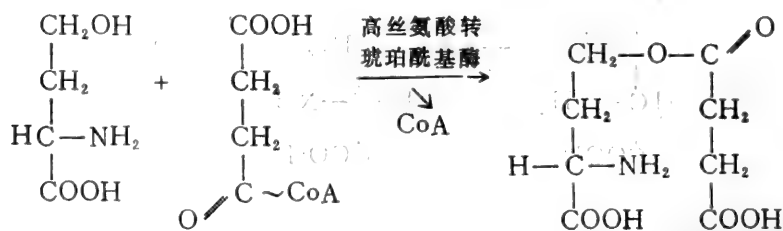
这一合成是由高丝氨酸激酶和苏氨酸合酶两个酶催化，反应如下式。



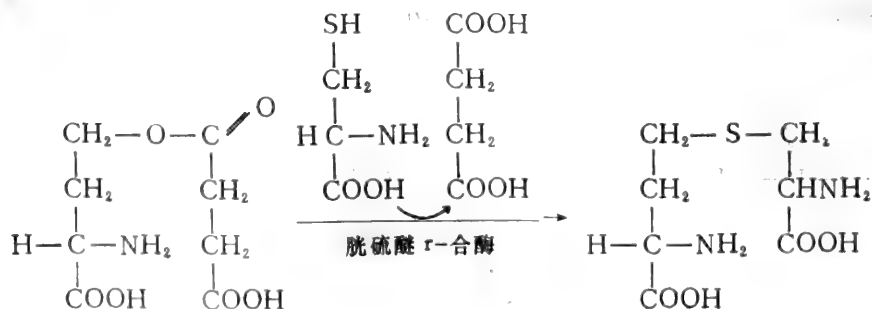


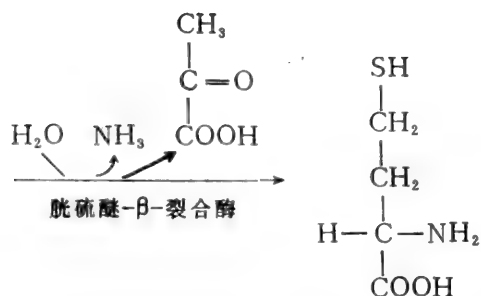
3. 由高丝氨酸合成甲硫氨酸

这一合成途径需要四种酶参加。首先是在高丝氨酸转琥珀酰基酶催化下，把琥珀酰—CoA 的琥珀酰基转移到高丝氨酸的醇—OH 上形成酯键。这个酶也受甲硫氨酸的反馈抑制以调节甲硫氨酸的合成。

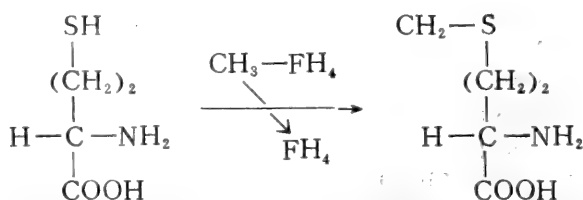


然后在胱硫醚-γ-合酶催化下4-琥珀酰高丝氨酸与半胱氨酸反应形成一个混合醚——胱硫醚。这个混合醚再在胱硫醚-β-裂合酶催化下，裂解出一个丙酮酸和—NH₃分子形成高半胱氨酸。





在大肠杆菌中，最后由高半胱氨酸转甲基酶（又称甲硫氨酸合酶）催化，把 N^5 -一甲基四氢叶酸的一个甲基转移到高半胱氨酸-SH 上形成甲硫氨酸，该酶的辅基为还原型甲基钴素。



由门冬氨酸合成其它氨基酸的过程及合成的调节关系可总结如图11-6。

二、由谷氨酸合成其它氨基酸

由谷氨酸经转氨而合成其它氨基酸已在本章第三节详述。谷氨酸的整个碳架及 $-\text{NH}_2$ 可一起用来合成其它氨基酸。例如谷氨酸可转变为脯氨酸、鸟氨酸、赖氨酸等。

（一）由谷氨酸转变为脯氨酸、鸟氨酸和精氨酸

在许多微生物中，谷氨酸的五碳链可作为形成脯氨酸和鸟氨酸的碳架。其反应首先是在谷氨酸激酶催化下形成 γ -谷氨酸磷酸，然后再在谷氨酸半醛脱氢酶催化下形成谷氨酸半醛。

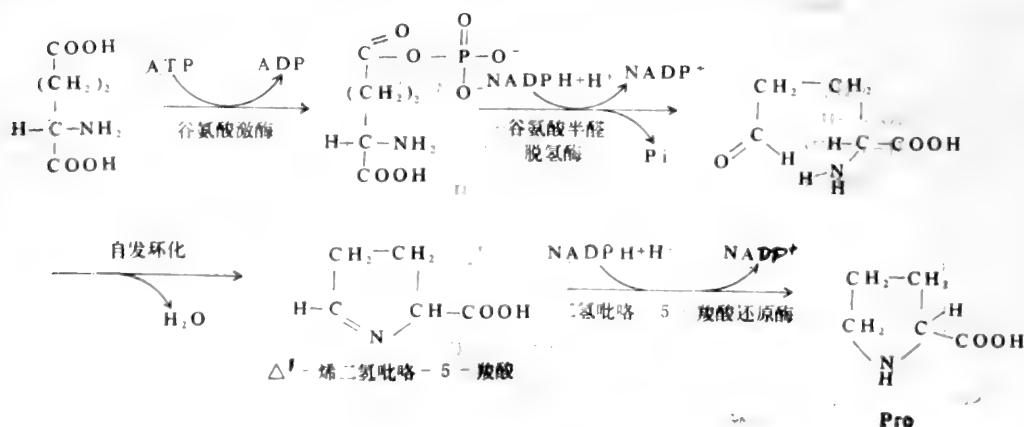


图11-7 谷氨酸转变为脯氨酸的过程

谷氨酸半醛可自动环化成 Δ^1 -烯二氢吡咯-5-羧酸，接着在二氢吡咯-5-羧酸还原酶催化下还原成脯氨酸。整个反应如图11-7。终产物脯氨酸是谷氨酸激酶的反馈别构抑制剂。这个反应的逆反应可使脯氨酸转变为谷氨酸。

在大肠杆菌中，谷氨酸要转变为鸟氨酸，则在谷氨酸与ATP作用之前首先必需先乙酰化形成乙酰谷氨酸，以免在谷氨酸 α -半醛形成之后自动环化。这个乙酰基在转氨形成乙酰鸟氨酸之后可水解除去。在植物中，此乙酰基可直接转给另一分子谷氨酸，再生成乙酰谷氨酸。整个反应如图11-8。

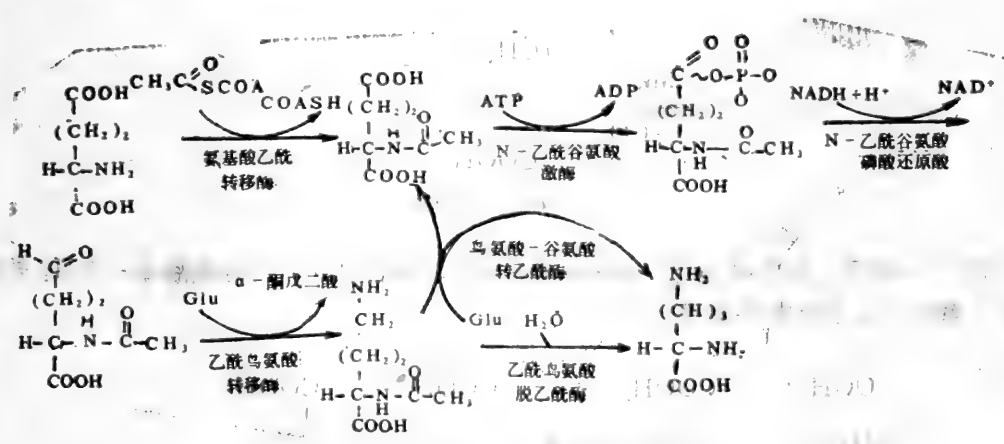


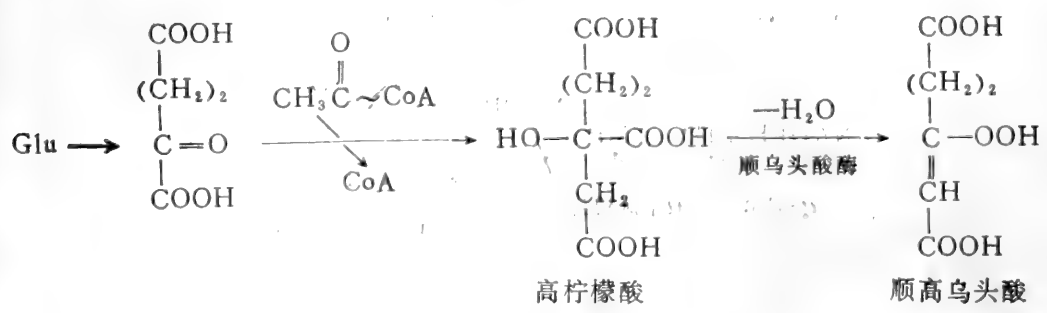
图11-8 谷氨酸形成鸟氨酸过程图

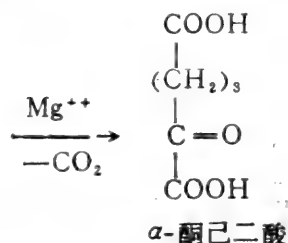
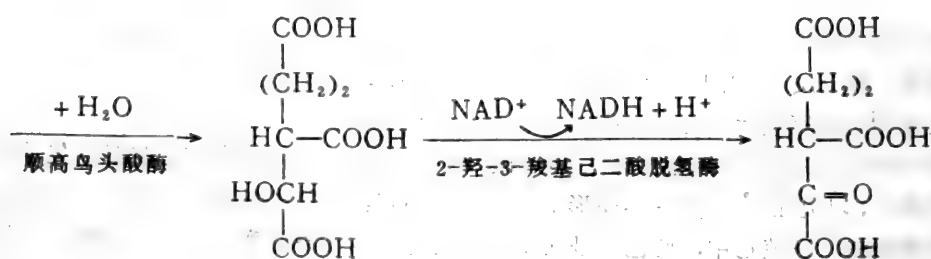
鸟氨酸经鸟氨酸循环（氨基酸分解代谢一节）形成精氨酸。

(二)由谷氨酸转变为赖氨酸

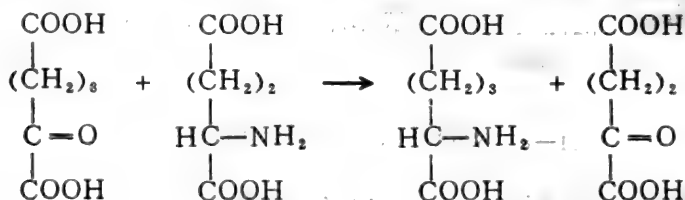
在细菌和绿色植物中由门冬氨酸半醛和丙酮酸缩合合成赖氨酸已如上所述。然而在真菌和眼虫藻中，赖氨酸可由另外一途径合成，其中包括用 α -酮戊二酸与乙酰-CoA 缩合的反应途径。首先由高柠檬酸合酶催化二者缩合生成高柠檬酸，再经高柠檬酸脱水加水经高顺乌头酸生成高异柠檬酸，然后再氧化脱羧形成 α -酮己二酸（这一途径类似于三羧酸循环中由草

酰乙酸与 $\text{CH}_3\text{-C(=O)-SCoA}$ 缩合生成 α -酮戊二酸的反应）。整个过程及催化的酶示如下式。

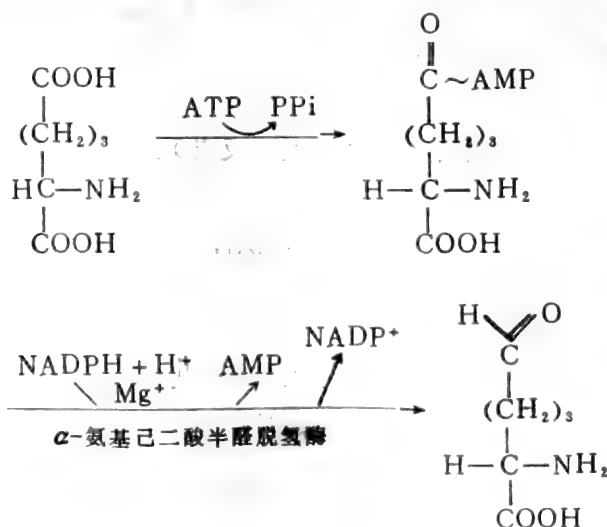


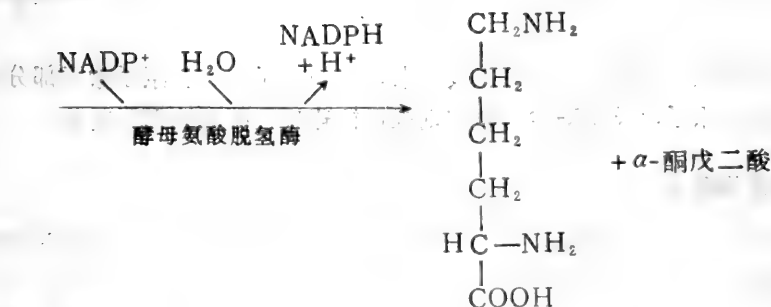
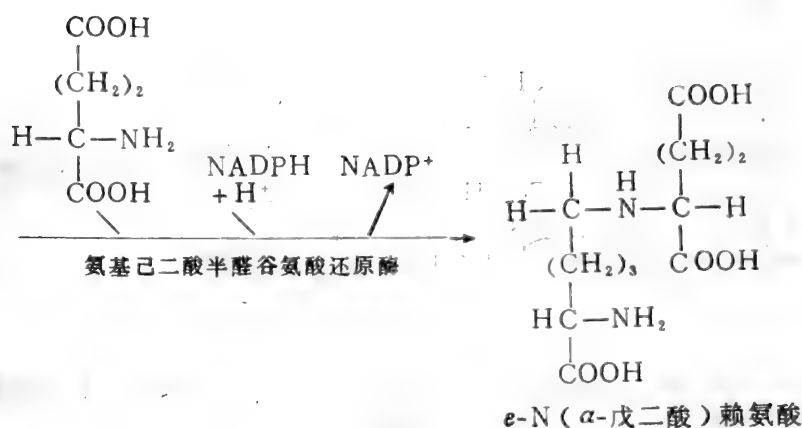


所得的 α -酮己二酸在 α -酮己二酸——谷氨酸转氨酶催化下，将谷氨酸的一 NH_2 转至 α -酮己二酸的氨基上形成 α -氨基己二酸。



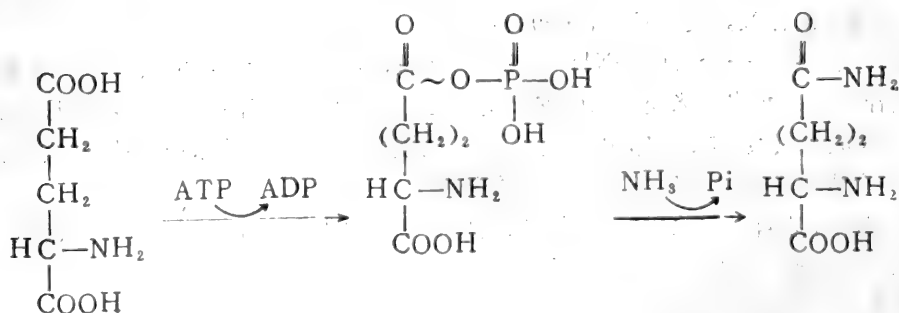
从 α -氨基己二酸形成赖氨酸还要经过 δ -羧基的腺苷酰化、还原，以及进一步再与一个谷氨酸反应，脱氢等步骤才能完成。反应步骤及所包含的催化酶系如下式。

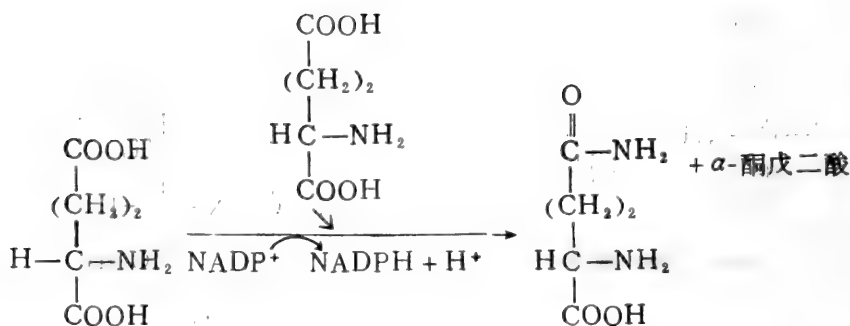




总之在这一途径中，赖氨酸的两个 -NH_2 来自两个谷氨酸，其碳架则来自一个谷氨酸的 α -酮戊二酸骨架和乙酰-CoA。

谷氨酸除能进行上述转变形成其它氨基酸外，它还可通过两个不同途径合成谷酰胺。一是由谷酰胺合成酶催化经 γ -谷氨酰磷酸而形成谷酰胺。另一途径是两个谷氨酸分子相互转 -NH_2 生成谷酰胺和 α -酮戊二酸。该反应由谷氨酸合酶催化。





除谷氨酸、门冬氨酸可转变成许多氨基酸外，其它氨基酸也可转变为谷氨酸和门冬氨酸，如谷酰胺、脯氨酸、鸟氨酸和组氨酸等都可转变为谷氨酸。

此外，其它氨基酸之间的转变在生物体特别是微生物和植物中是一种普遍现象。如苯丙氨酸和酪氨酸之间的相互转变；半胱氨酸和甲硫氨酸间的相互转变、缬氨酸和亮氨酸之间的相互转变等。

某些氨基酸如组氨酸、色氨酸合成途径较复杂。它们分子中的氮原子除了部分来自谷酰胺的酰胺氮外，其它氮原子以及氨基酸的碳架则来自核苷酸及磷酸核糖等前体。

三、组氨酸的生物合成

在所有植物和微生物中，组氨酸的生物合成包括把 ATP 的嘌呤 N—1 和 C—2 转移到 5-磷酸核糖-1-焦磷酸上等十个步骤。

① ATP 与 5-磷酸核糖-1-焦磷酸 (pRpp) 反应。这一步是由 ATP—磷酸核糖转移酶催化 ATP 的嘌呤 N—1 从 pRpp 的 β -方向亲核攻击 pRpp 的糖苷碳原子，消去一个 PPi 而形成 N^1 —(5'-磷酸核糖)—AMP。反应见图 11—9(1)。

② 在焦磷酸酶催化下， N^1 —(5'-磷酸核糖)—ATP 的 ATP 上水解除去一个 PPi 生成 N^1 —(5'-磷酸核糖)—AMP。反应见图 11—9(2)。

③ 嘌呤环的开环反应。在磷酸核糖—AMP 环水解酶催化下， N^1 —(5'-磷酸核糖)—AMP 开环形成 5'-磷酸核糖-亚氨基-5-氨基咪唑-4-甲酰胺核苷酸。反应见图 11—9(3)。

④ 异构化反应。在磷酸核糖亚胺甲基-5-氨基咪唑-4-甲酰胺核苷酸异构酶催化下，5-磷酸核糖-亚胺甲基-5-氨基咪唑-4-甲酰胺核苷酸异构化成为 5-磷酸核酮糖-亚胺甲基-5-氨基咪唑-4-甲酰胺核苷酸。反应见图 11—9(4)。

⑤ 由谷酰胺转移一个酰胺— NH_2 于 5-磷酸核酮糖的酮基碳上，消去一个 5-氨基咪唑-4-甲酰胺核苷酸，并环化成咪唑甘油磷酸。反应见图 11—9(5)。咪唑甘油磷酸是形成组氨酸的前体，它构成组氨酸的咪唑环和侧链骨架，而裂解出的 5-氨基咪唑-4-甲酰胺核苷酸这是 IMP 从头合成的中间物 (见十二章核苷酸合成)。

⑥ 在咪唑甘油磷酸脱水酶催化下，咪唑甘油磷酸脱水生成咪唑丙酮醇磷酸，图 11—9(6)。

⑦ 咪唑丙酮醇-磷酸与谷氨酸进行转氨反应生成组氨醇磷酸。见图 11—9(7)。

⑧ 组氨醇磷酸在磷酸酶催化下水解除去 Pi ，再经两步脱氨反应即成组氨酸。该脱氢酶为组氨醇脱氢酶，以 NAD^+ 为辅基。反应见图 11—9(8)(9)。

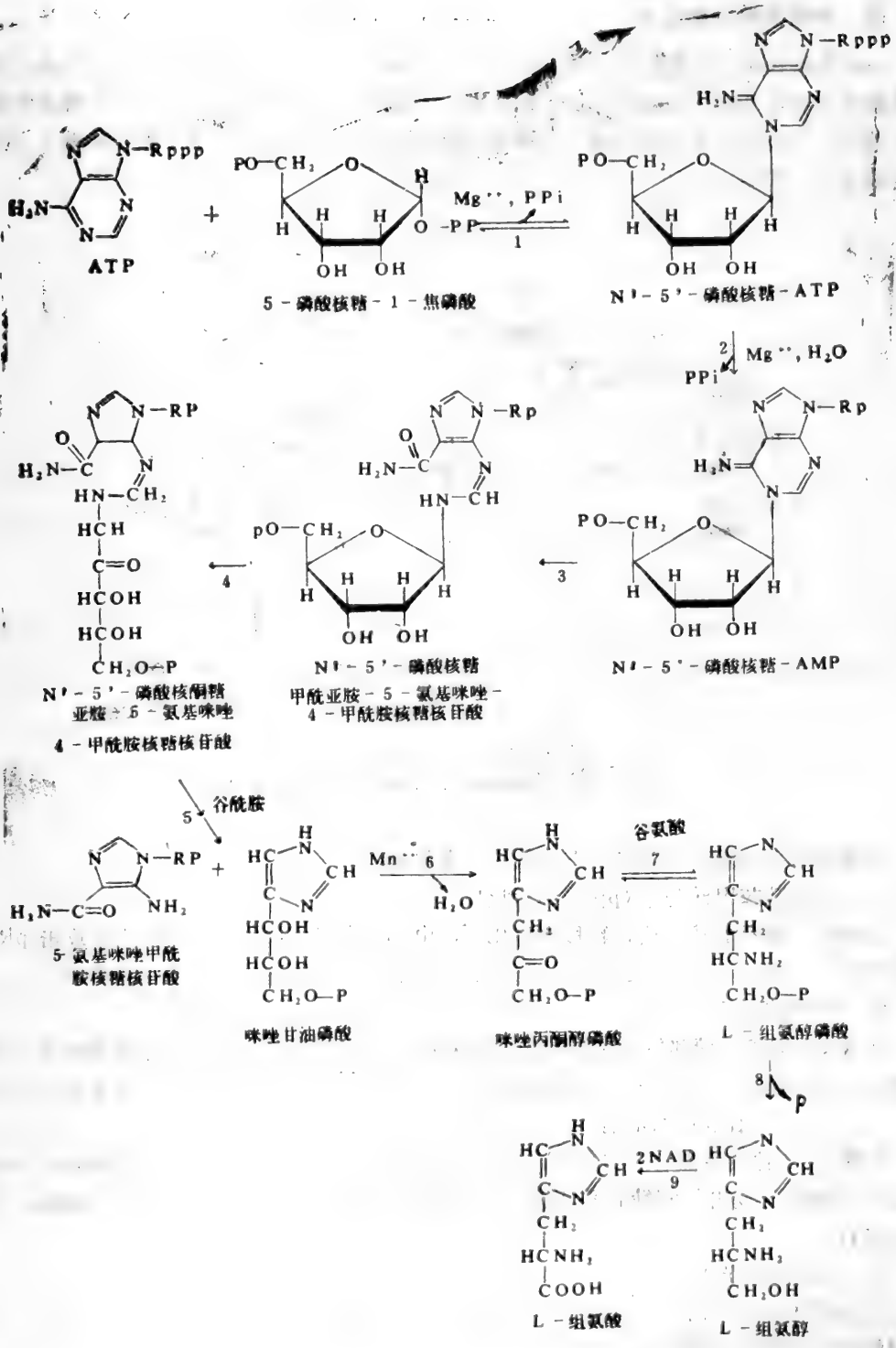


图11--9 组氨酸的合成全图

四、色氨酸的生物合成

在高等植物中，色氨酸的合成途径尚不甚了解，但它在大肠杆菌中的合成与苯丙氨酸、酪氨酸等芳香氨基酸的合成有一段共同途径。本章第二节介绍的苯丙氨酸和对羟苯丙氨酸的合成都经过分枝酸。在大肠杆菌中这个分枝酸在需谷酰胺的邻氨基苯甲酸合酶催化下形成邻氨基苯甲酸。如图11—10。

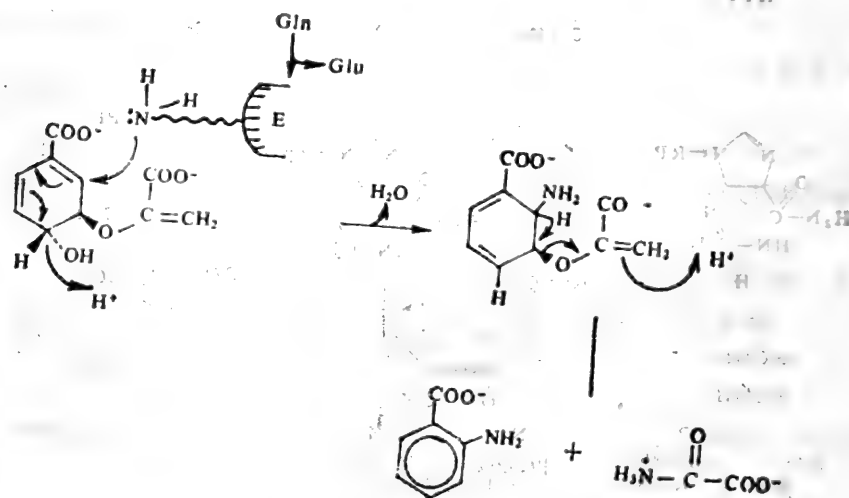


图11—10 分枝酸形成邻氨基苯甲酸的过程

邻氨基苯甲酸然后经四步反应才能合成色氨酸。

1. 邻氨基苯甲酸与 pRpp 的缩合反应

在邻氨基苯甲酸磷酸核糖转移酶催化下，由邻氨基苯甲酸的一 NH_2 亲核攻击 pRpp 的糖苷碳原子。消去 PPi 而成为 N-5'-磷酸核糖邻氨基苯甲酸。反应如图11—11(1)。

2. 异构化反应

在 N-5'-磷酸核糖邻氨基苯甲酸异构酶催化下，N-5'-磷酸核糖邻氨基苯甲酸发生分子内的氧化还原重排反应，生成1-(邻-羧苯氨基)-1'-脱氧核酮糖-5-磷酸，反应见图11—11(2)。

3. 吲哚-3-甘油磷酸的合成

在吲哚-3-甘油磷酸合酶催化下，1-(邻-羧苯氨基)-1'-脱氧核酮糖-5-磷酸上的邻-羧基脱去，该碳亲核攻击核酮糖的酮基碳，使之环化形成吲哚，生成吲哚-3-甘油磷酸。反应见图11—11(3)。

4. 色氨酸的形成

在色氨酸合酶催化下，吲哚-3-甘油磷酸和丝氨酸间进行裂合反应。吲哚-3-甘油磷酸首先裂解出3-磷酸甘油醛。再在磷酸吡哆醛的参与下把丝氨酸的 β -碳原子转移到吲哚环上形成色氨酸。见图11—11(4)。

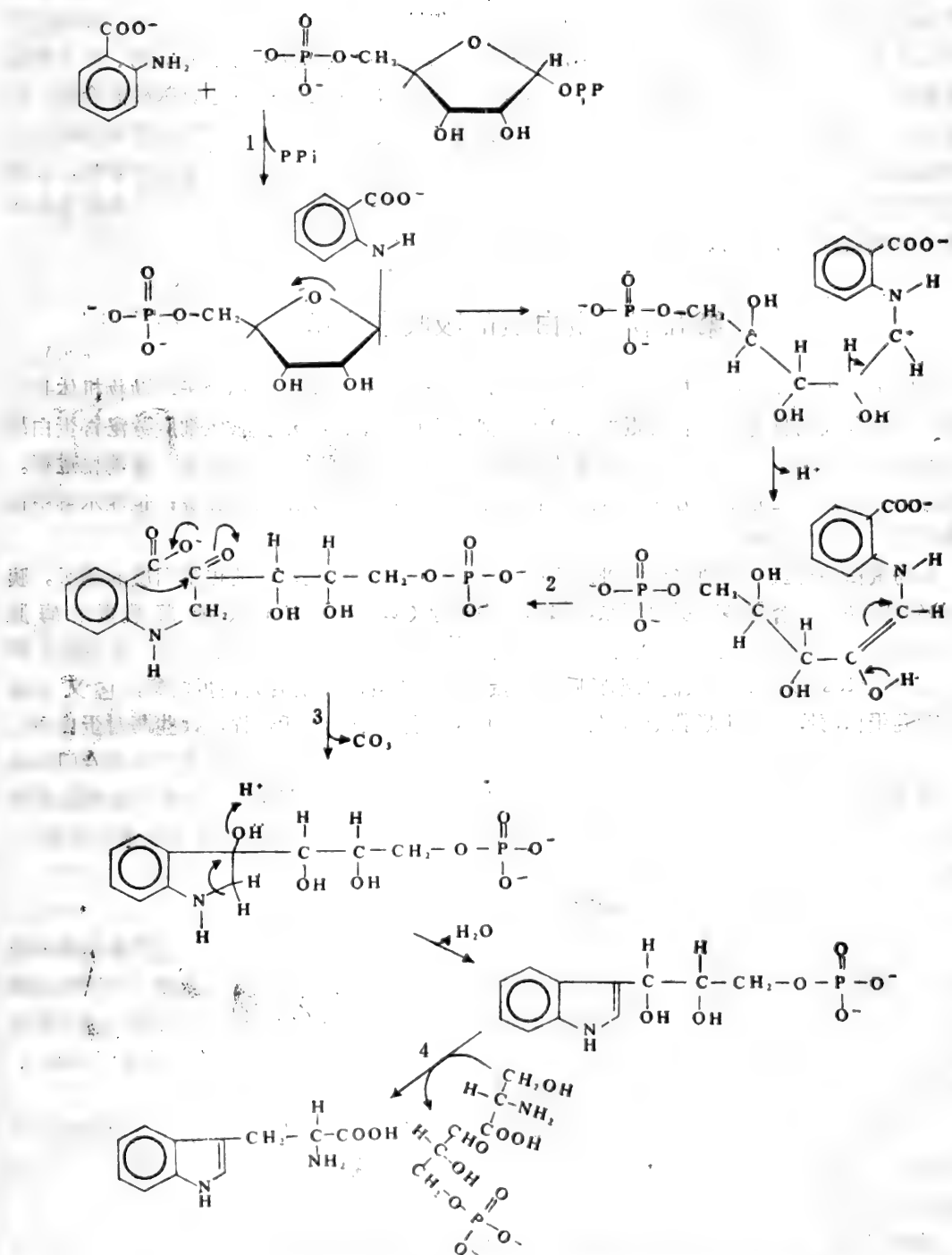


图11-11 由邻氨基苯甲酸与5-磷酸核糖-1-焦磷酸合成色氨酸的反应过程

不论是动物、植物，还是微生物，都需要把氨基酸合成机体的蛋白质和各种必需的含氮化合物。这些合成过程的能力决定于体内20种氨基酸是否能不断地供应和平衡。植物和微生物靠自己的合成机制调节各种氨基酸的平衡。动物大约有一半的氨基酸不能象植物和微生物那样从头合成。即动物不能合成那些必需氨基酸，必需不断从食物中摄取（植物、微生物或其它动物）。如成人为了维持其正常生命活动，每天必需吃进20—150克氨基酸混合物。但为了使体内各种氨基酸的平衡符合体内的需要，并不是摄入的氨基酸都用来合成蛋白质。一部分氨基酸经分解脱氨可合成体内的非必需氨基酸，一部分用来合成其它含氮化合物，多余的氮则以不同形式排出体外。分解出的碳架部分可分解供能，也可转变为糖（生糖氨基酸）或脂（生酮氨基酸）贮藏。

第五节 蛋白质的吸收和水解

食物蛋白质是动物体氨基酸的主要来源。食物蛋白质不经消化成小分子，动物机体是不能吸收的。人或动物的胃中有胃蛋白酶，可以把蛋白质水解。胃粘膜的主细胞分泌胃蛋白酶原（pepsinogen），它经胃酸激活成胃蛋白酶，这是食物蛋白进入体内的第一道消化过程。该酶专一性不强，优先水解芳香氨基酸和长链脂肪氨基酸羧基所形成的肽键；也能水解甲硫氨酸等羧基形成的肽键。

食物蛋白经胃蛋白酶消化后，进入小肠进一步消化，小肠是动物消化蛋白质的场所。胰脏分泌的胰液中，含有多种蛋白酶原，如胰蛋白酶原（trypsinogen）、胰凝乳蛋白酶原（chymotrypsinogen）、羧肽酶原A和B（procarboxypeptidaseA和B）、弹性蛋白酶原（proelastase）等。胰液流入小肠后，胰蛋白酶原被肠激酶激活成胰蛋白酶，它又去激活胰凝乳蛋白酶原成为胰凝乳蛋白酶。其它酶原也都要有一个激活过程。这些酶对蛋白质的水解都各有专一性。如胰蛋白酶专门水解碱性氨基酸形成的肽键；胰凝乳蛋白酶则专门水解芳香氨基酸和长链脂肪氨基酸形成的肽键；羧肽酶A水解C-端芳香氨基酸和长链脂肪氨基酸及除碱性氨基酸外所有氨基酸的C-端肽键；弹性蛋白酶水解中性脂肪氨基酸羧基形成的肽键。

此外，小肠粘膜也能分泌氨肽酶和羧肽酶以及二肽酶等。

食物蛋白质经胃、肠道后，在各种蛋白酶的催化下水解成各种氨基酸。这些氨基酸的吸收主要由肠粘膜上皮细胞进行。它们经门静脉进入肝脏，再经血流运送至全身各组织的细胞。未经消化的小肽或蛋白质，在肠道内由肠道微生物分泌蛋白酶水解成氨基酸，这些氨基酸亦可吸收利用。另外肠道微生物还可将氨基酸分解成胺、醇、酮酸、酚、吲哚、 CH_4 、 CO_2 等，其中多数对机体有害，可由肠道排出。

植物中亦有蛋白酶存在，特别是种子、果实中尤多。种子发芽时，特别是豆科植物种子发芽时，发生强烈的蛋白水解作用，把胚乳或子叶中的贮藏蛋白水解成各种氨基酸，以供幼嫩植物合成组织蛋白之用。

凡能利用蛋白质的微生物都能分泌蛋白酶，使基质中的蛋白质得到水解，水解产物作为合成菌体蛋白质的原料。如栖土曲霉、枯草杆菌等就能分泌较大量的蛋白酶。工业上采用这些细菌进行培养以制备蛋白酶制剂。

吸收到生物机体内的氨基酸可进一步分解，主要是进行脱 NH_3 或转氨，也可脱羧分解。

第六节 氨基酸的脱氨反应

氨基酸的脱氨和转氨是体内氨基酸分解的第一步。究竟那一个分解途径占优势则视生物种类和组织而异

一、氨基酸的脱氨基作用

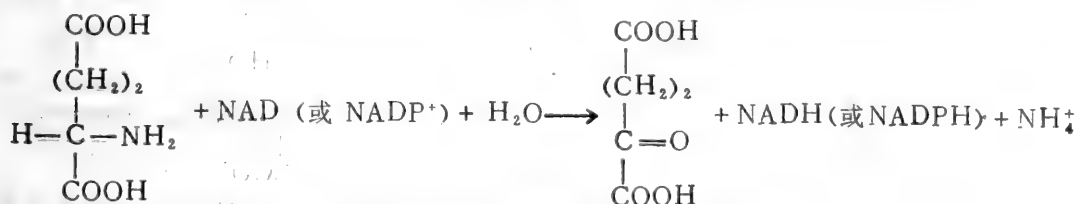
根据脱氨方式不同，可分为氧化脱氨和非氧化脱氨等。

(一) 氧化脱氨

氧化脱氨有两种类型：一类是靠脱氢酶催化的氧化脱氨，另一类是靠氧化酶催化的脱氨反应。

1. 脱氢酶催化的氧化脱氨反应

谷氨酸脱氢酶是唯一存在于生物体内的专一性高活性的氨基酸脱氢酶，它广布于动植物及微生物体内，以 NAD 或 NADP^+ 为辅酶，它专一性催化谷氨酸的脱氢脱氨反应。总反应如下式。



在哺乳动物肝脏中，含有高浓度的谷氨酸脱氢酶，它定位于线粒体中。牛肝线粒体纯化的谷氨酸脱氢酶，其最小活力单位的 $M. W = 336,000\text{dt}$ ，它是由六个相同亚基构成的六聚体，亚基排列如图11—12。每个亚基是含有 500 氨酰基的多肽。六聚体易聚合成线性多聚体，这种多聚体也具有活性，其分子量可达几百万。谷氨酸脱氢酶的活性能为某些调节剂所调节。能为 GTP 和 ATP 所抑制，也能为 NADH 和 5'-吡哆醛所抑制，但可被 GDP 和 ADP 等所刺激。酶中每个亚基都有分开的底物、辅酶及一些核苷酸效应剂的结合部位，以调节酶的活性。另外谷氨酸脱氢酶受激素的调节，如去甲肾上腺素抑制酶的活性，而肾上腺素则激活酶的活性。

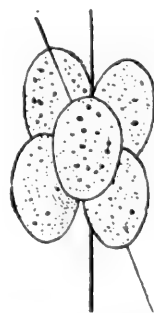


图11—12 六聚体谷氨酸脱氢酶亚基的排列方式

谷氨酸脱氢酶催化谷氨酸脱氨脱氢机制如 P512 反应所示。

其它氨基酸的脱氨可通过将 $-\text{NH}_2$ 转移给 α -酮戊二酸的转氨反应形成谷氨酸和相应酮酸，然后再通过谷氨酸脱氢酶催化脱氨。在这里谷氨酸起着 NH_3 的载体作用。各种氨基酸通过这一途径脱氨主要受谷氨酸脱氢酶活性的调节。这一脱氨方式又称联合脱氨。可示如图11—13。

联合脱氨过程是生物体内氨基酸脱氢酶的重要而普遍的形式。这个脱氨途径是可逆的，亦是生物体合成氨基酸的重要途径（见氨基酸合成一节）。

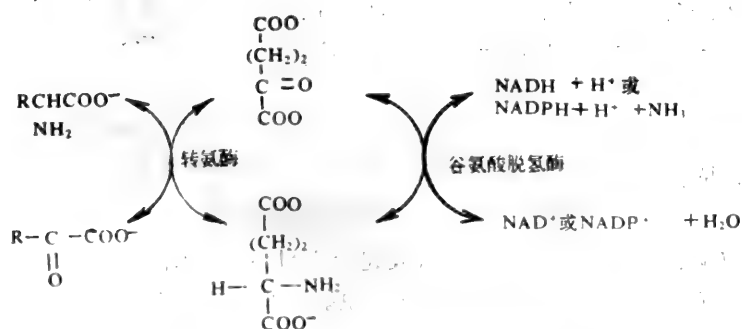
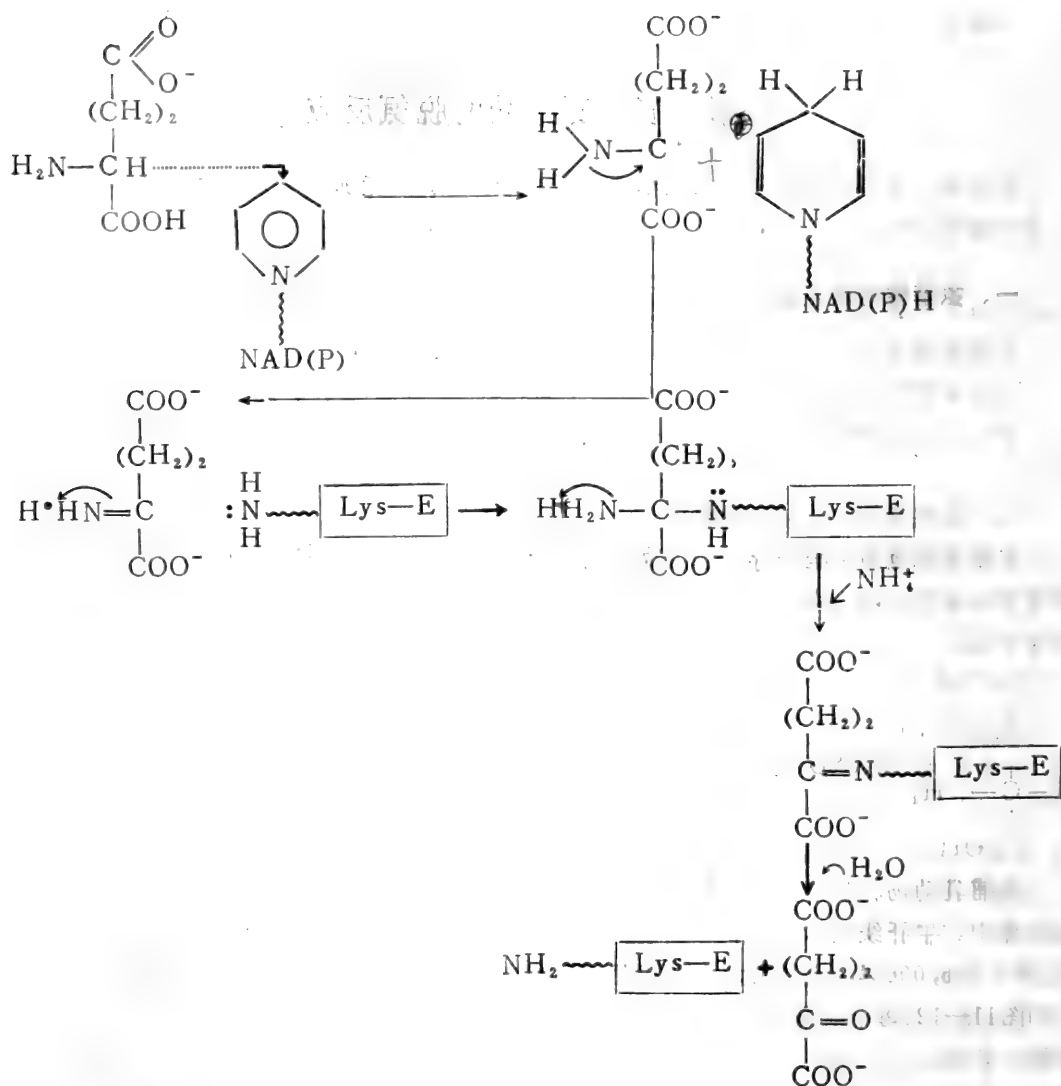


图11-13 氨基酸的联合脱氨图

在骨骼肌及心肌中，L-谷氨酸脱氢酶活性较低，氨基酸在那儿不易借此联合脱氨方式脱氨基。在这些组织中，转氨作用产生的谷氨酸，可通过谷草转氨酶催化，把氨基转移至草酰乙酸上形成门冬氨酸，然后由腺苷酸琥珀酸合成酶和裂合酶催化把

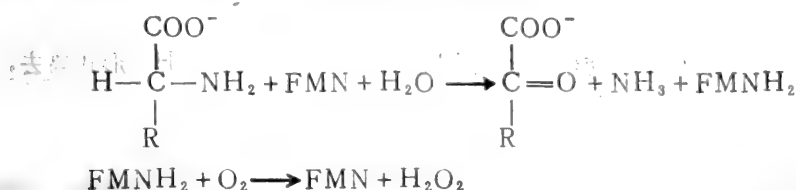
-NH₂ 转移到 IMP 上，形成 AMP（详细过程见核苷酸合成一节）。此后再由腺苷酸脱氨

酶催化 AMP 脱氨重新生成 IMP。这实际上也是一联合脱氨方式，是通过转氨和嘌呤核苷酸循环的联合脱氨。除肌肉组织外，脑及肝脏组织中有些氨基酸可通过这一途径脱氨。

前已述及可通过谷氨酸转氨基到各种酮酸上而合成不同的氨基酸（除苏氨酸和赖氨酸外）。事实上此反应是可逆的，各种氨基酸分解时都可通过转氨于 α -酮酸而脱氨。关于转氨反应、转氨酶及转氨机制见氨基酸合成一节。

2. 氧化酶催化的氧化脱氨作用

氨基酸氧化酶有 L-氨基酸氧化酶和 D-氨基酸氧化酶。除谷氨酸脱氢酶催化体内 L-氨基酸脱氨的主要脱氨途径外，生物体的 L-氨基酸可通过 L-氨基酸氧化酶催化的次要途径氧化脱氨。该酶以 FMN 或 FAD 为辅基，总反应如下式。



H_2O_2 则可由过氧化氢酶分解。

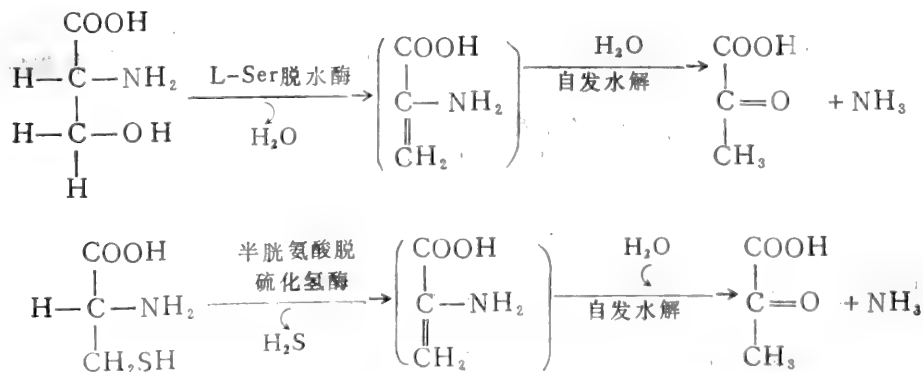
肝脏和肾脏中的 L-氨基酸氧化酶以 FMN 为辅基。蛇毒和某些微生物中的 L-氨基酸氧化酶则以 FAD 为辅基。L-氨基酸氧化酶可催化除丝氨酸、苏氨酸和二羧基氨基酸以外的所有 L-氨基酸的氧化。

D-氨基酸虽然在活体内存在量极少，但 D-氨基酸氧化酶在生物体内则普遍存在。肝脏和肾脏中为何有高活性的 D-氨基酸氧化酶存在，至今还是一个谜。这个氨基酸氧化酶并不氧化细菌细胞壁的 D-氨基酸。但它可氧化甘氨酸，而且甘氨酸是该酶最适底物。

(二)非氧化脱氨

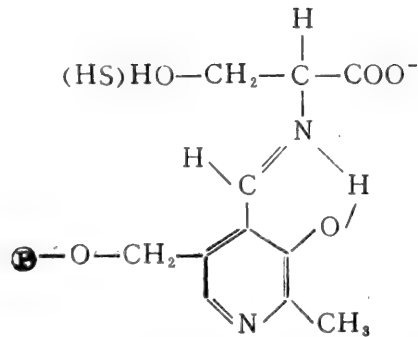
1. 脱水脱氨和脱硫化氢脱氨

大肠杆菌、链球菌和动物体含有氨基酸脱水酶和氨基酸脱硫化氢酶，它们可分别催化 L-丝氨酸、L-苏氨酸和 L-半胱氨酸甚至高丝氨酸和高半胱氨酸脱氨。该酶需磷酸吡哆醛作辅基。反应如下式所示。



这两类酶的脱氨机制都是首先由 L-丝氨酸或半胱氨酸与酶的辅基磷酸吡哆醛结合形成

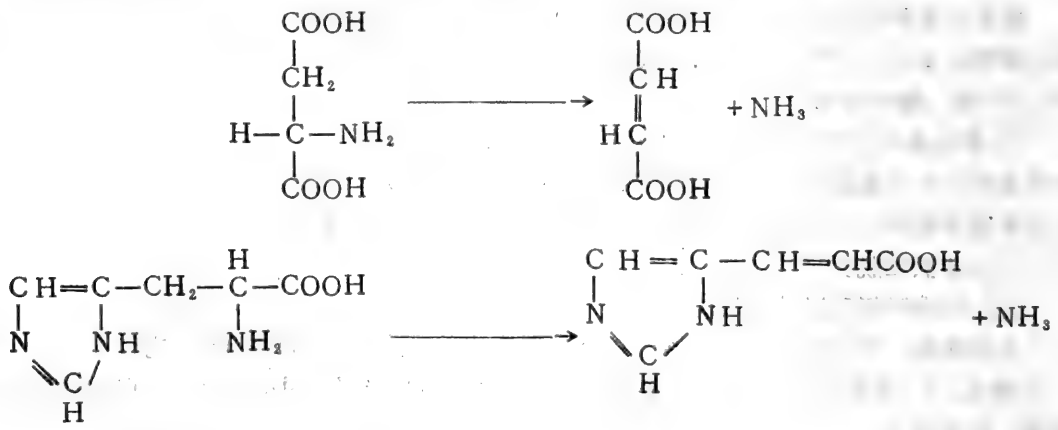
Schiff's 碱开始的，如下式。



由于芳环共轭体系的拉电子作用，使丝氨酸或半胱氨酸的 α -氢易于以 H^- 形式离去，从而易于与 $\beta\text{-OH}$ 或 $\beta\text{-SH}$ 脱水或脱 H_2S 而成含 α, β 双键的形式。

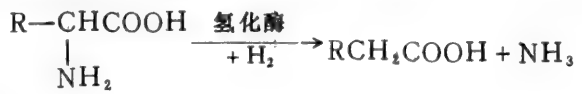
2. 分解脱氨

大肠杆菌等微生物中有 L-门冬氨酸酶，该酶可催化门冬氨酸脱氨形成烯酸。动物体内存在着组氨酸脱氨酶，催化组氨酸脱氨成烯酸。



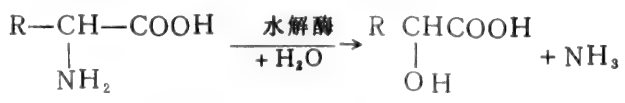
3. 还原脱氨

某些微生物含有氢化酶，在严格无氧条件下，能进行还原脱氨形成 NH_3 和羧酸。



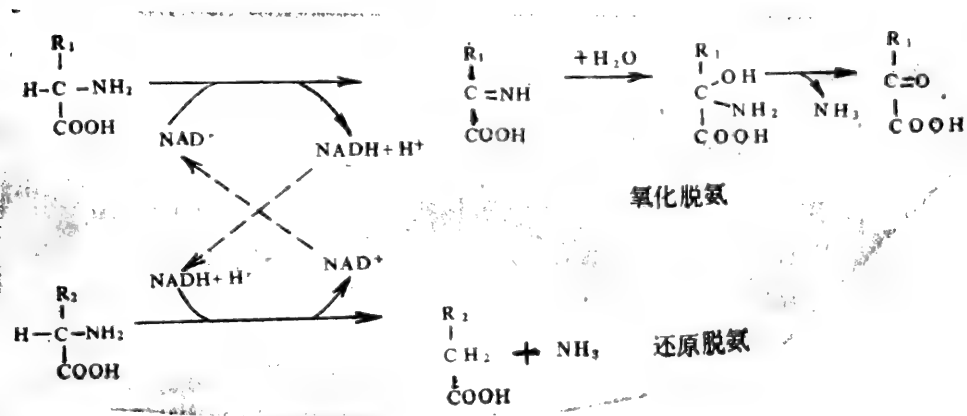
4. 水解脱氨

在水解酶作用下，氨基酸可水解形成 NH_3 和羧酸。



5. 氨基酸之间氧化还原联合脱氨

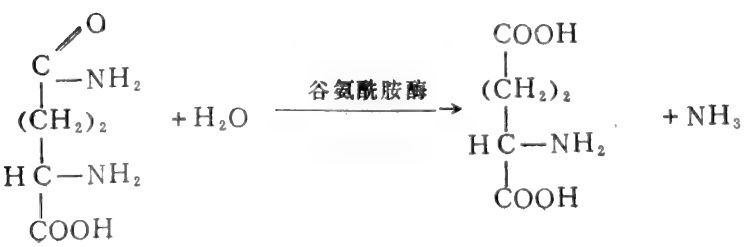
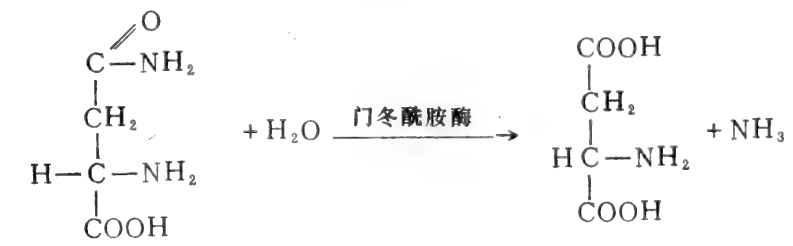
在厌氧细菌中常进行这类脱氨方式，以分解氨基酸。



从上式可以看出， $\begin{array}{c} \text{R}_1 \\ | \\ \text{H}-\text{C}-\text{NH}_2 \\ | \\ \text{COOH} \end{array}$ 作为氢供体，而 $\begin{array}{c} \text{R}_2 \\ | \\ \text{H}-\text{C}-\text{NH}_2 \\ | \\ \text{COOH} \end{array}$ 则作为氢受体。二者联合反应时，第一个氨基酸被氧化而第二个氨基酸则被还原。此反应以 NAD^+ 作为氢载体。

二、氨基酸脱酰胺基作用

谷酰胺和门冬酰胺在相应酰胺酶催化下，酰胺基上的 $-\text{NH}_2$ 可以脱去，生成相应的氨基酸。酰胺酶广布于植物和微生物中，有较高专一性。



第七节 氨基酸脱氨产物的代谢去路

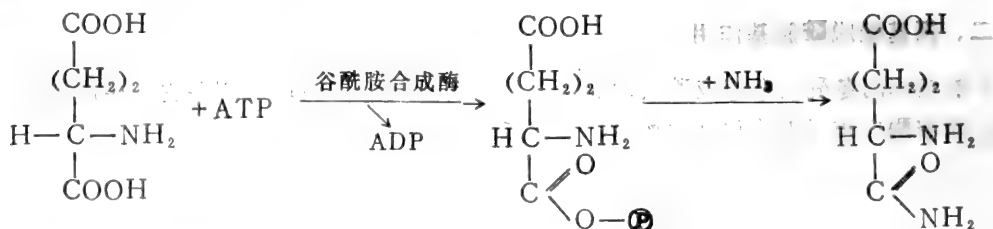
氨基酸脱氨产物为 NH_3 和酮酸，少量产生烯酸。

一、氨的去路

氨基酸脱下的氨，除植物和部分微生物可以 NH_3 盐形式贮存外，大部分 NH_3 必需转变成其它形式贮存，或排出体外。特别是动物，自由 NH_3 对机体是有毒的，一旦生成则必需予以处理。生物体处理游离 NH_3 大致有四条途径：一是重新合成机体所需的氨基酸（见氨基酸合成一节）；二是合成氨甲酰磷酸，再用它合成核苷酸（见核苷酸合成）或其它氨基酸；三是转变为酰胺，贮藏于体内；四是转变为一些无毒化合物排出体外。这里重点介绍第四种氨处理形式。

动物处理 NH_3 的第四种方式因种属而异。多数陆生脊椎动物把 NH_3 转变成无毒的尿素排出体外。这些动物称为排尿素动物。大多数水生动物将 NH_3 直接排出体外，称为排氨动物。鸟类和陆生爬行动物把 NH_3 转变为尿酸（以尿酸悬浮液排出体外），称为排尿酸动物。两栖类如蛙在蝌蚪期排氨，变态成蛙时其肝脏中已产生出必需的酶，则排尿素。植物体不合成尿素，也不排氨而是以酰胺形式贮存于体内。

排氨机制比较简单，一般机体各部分脱下的 NH_3 ，首先以谷酰胺形式运至肾小管，再在谷酰胺酶催化下，释放 NH_3 而排出体外。



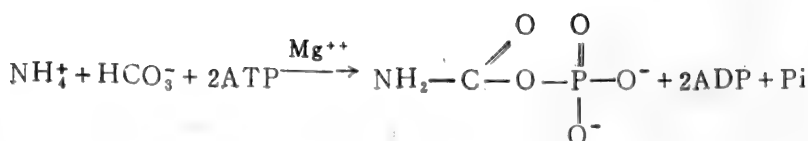
尿酸的合成与嘌呤合成有关，见核苷酸合成一节。

尿素的合成是一个较为复杂的过程。高等动物体尿素的形成可分为三个阶段：第一阶段是鸟氨酸与 NH_3 及 CO_2 作用合成瓜氨酸。第二阶段是瓜氨酸转变为精氨酸。第三阶段是精氨酸水解成尿素并重新形成鸟氨酸。所以这一过程中的鸟氨酸、瓜氨酸、精氨酸只不过是合成尿素的氮源和碳源的载体，从鸟氨酸开始到鸟氨酸重新形成，成为一个循环。因而尿素合成的循环过程又称鸟氨酸循环过程。这个循环过程中的具体反应过程为：

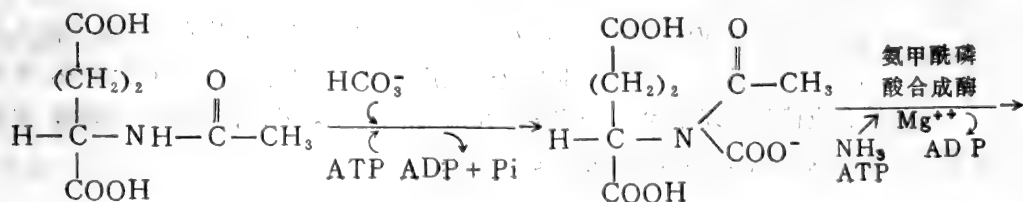
（一） NH_3 与 CO_2 合成氨甲酰磷酸

游离的 NH_3 在线粒体的氨甲酰磷酸合成酶催化下，与 CO_2 反应合成氨甲酰磷酸。有两个不同的氨甲酰磷酸合成酶，称为氨甲酰磷酸合成酶 I 和酶 II。

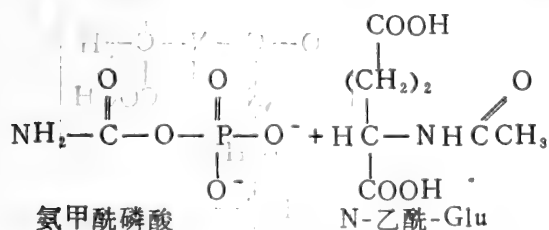
氨甲酰磷酸合成酶 I 位于肝线粒体中，不存在于其它组织中，它只利用 NH_3 作为氮源，需要 N-乙酰谷氨酸（AGA）作为正别构效应剂。这个酶的主要功能是提供氨甲酰磷酸以合



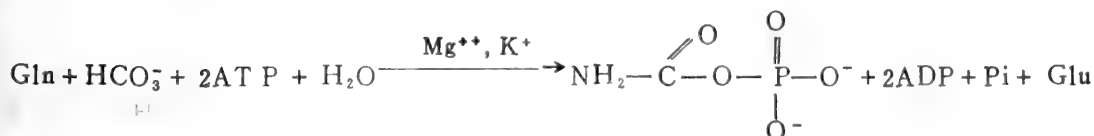
成精氨酸，从而合成尿素。由于 AGA 是氨甲酰磷酸合成所必需的，而精氨酸又可抑制 AGA 的合成，所以精氨酸对氨甲酰磷酸的合成起负反馈调节作用。这个酶首先利用一克分子 ATP，通过形成酶结合的羧基—磷酸而使 CO_2 活化，该酶复合物再与 NH_4^+ 反应，形成酶结合的氨基甲酸，并释放一个磷酸。此酶结合的氨基甲酸又与第二克分子 ATP 反应，产生氨甲酰磷酸、ADP 和自由酶。反应如下式。



N-乙酰-Glu



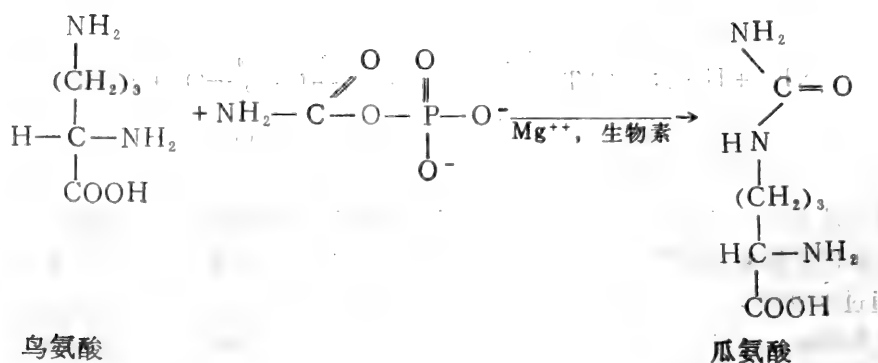
氨甲酰磷酸合成酶 I 需要谷酰胺作为氮供体，不需要 N-乙酰谷氨酸。所催化反应如下式：



它存在于快速生长组织的细胞质中，为嘧啶合成提供氨甲酰磷酸，该酶可被 UTP 反馈抑制。

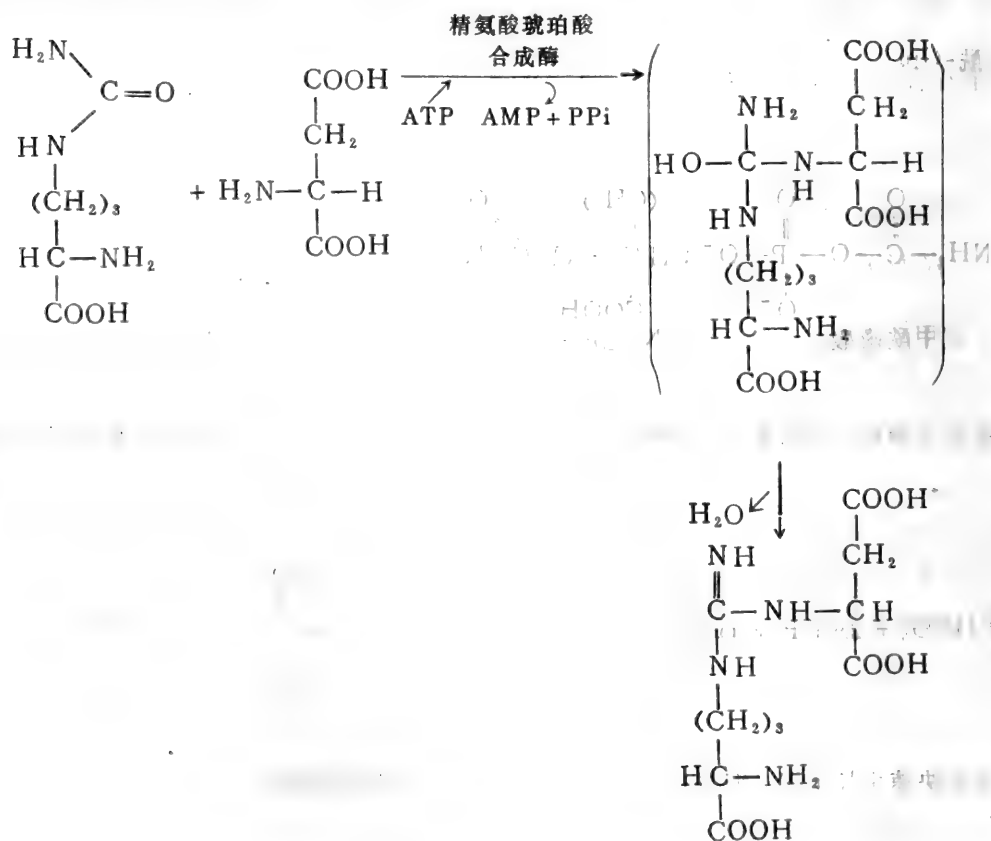
(二) 由氨甲酰磷酸与鸟氨酸合成瓜氨酸

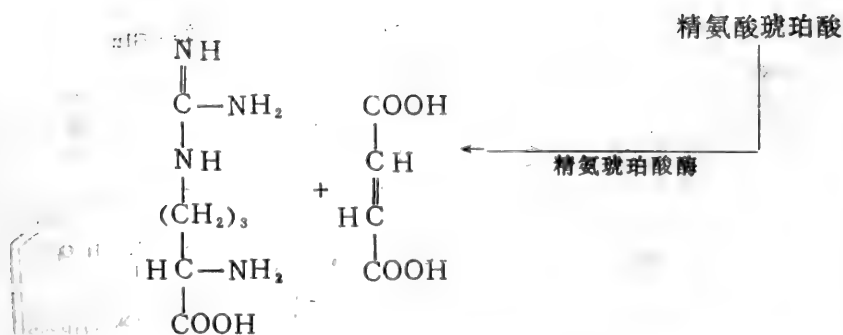
在鸟氨酸氨甲酰转移酶催化下，氨甲酰磷酸与鸟氨酸缩合形成瓜氨酸。该酶与氨甲酰磷酸合成酶 I 紧密结合，作为多功能蛋白的一部分。



(三)由瓜氨酸合成精氨酸

合成的瓜氨酸可穿过线粒体内膜进入胞液，氨基化成精氨酸。氨基化的氨基供体不是自由 NH_3 ，而是由门冬氨酸提供 $-\text{NH}_2$ 。催化这一反应的酶首先是精氨酸琥珀酸合成酶，使瓜氨酸与门冬氨酸缩合成精氨酸琥珀酸，该酶需要 ATP 和 Mg^{++} 。然后由精氨酸琥珀酸酶催化精氨酸琥珀酸裂解成精氨酸和延胡索酸。反应如下：



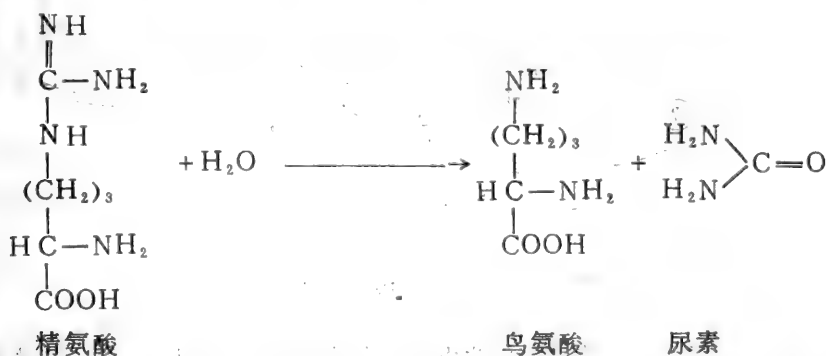


第一步反应由 ATP 水解成 AMP 供能，生成的 PPi 可水解成 Pi 促进反应的进行。

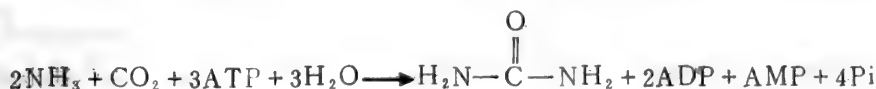
这一步反应中生成了延胡索酸，它是 TCA 循环的中间物，经加水、脱氢生成草酰乙酸，与谷氨酸进行转氨反应又可生成门冬氨酸。所以延胡索酸是 TCA 循环与鸟氨酸循环的连结点。

(四) 精氨酸水解成尿素，并重新形成鸟氨酸

在精氨酸酶催化下，精氨酸水解生成尿素，并重新产生鸟氨酸反应如下：



生成的鸟氨酸，可重新通过线粒体膜上的特异转运体而进入线粒体，再与氨甲酰磷酸结合进行第二次循环。每循环一周，合成一分子尿素。总反应式为：



整个合成过程示如图11-14。

尿素合成共需五种不同的酶，先天缺乏任一种酶，都会造成高血氨症和智力减退，如缺乏氨甲酰磷酸合成酶和鸟氨酸氨甲酰转移酶，则症状尤为严重。因为该两酶是尿素循环中限速步骤的酶，尿素循环的唯一作用是把氨转变为无毒的尿素，所以尿素合成中任一种酶的缺乏都会引起尿素合成失调，使血中 NH_4^+ 水平升高，而导致 NH_3 中毒。 NH_3 对排尿素动物特别是对其中枢神经有很大毒性，其原因是在线粒体中，在谷氨酸脱氢酶催化作用下， NH_3 与 α -酮戊二酸作用形成谷氨酸，如果 NH_3 太多，则会大量排除脑 TCA 循环中的 α -

氨酸脱氢酶的功能则倾向于氨化。然后，合成的谷氨酸经转氨反应合成门冬氨酸以用于尿素合成，及合成 N—乙酰谷氨酸以刺激氨甲酰磷酸的合成和谷酰胺的合成。因此，所有氨基酸能保持稳态平衡，TCA 循环可持续不断地运行，并且通过 肝脏处理过剩的 NH_3 以形成尿素。各种氨基酸通过血流渠道分布到各组织中，以适应每种组织随其代谢需要而对氨基酸的不同需要。

二、酮酸的代谢去路

氨基酸脱氨而生成酮酸，如 α -酮戊二酸可在谷氨酸脱氢酶催化下还原加氨而成谷氨酸。其它酮酸可在专一性转氨酶催化下与谷氨酸进行转氨反应，重新合成相应的氨基酸（见氨基酸合成一节）。此外，生成的 酮酸经氧化分解生成 CO_2 和 H_2O ，提供体内所需的能量。如丙酮酸、 α -酮戊二酸可经 TCA 循环彻底氧化成 CO_2 和 H_2O 。其它氨基酸形成的酮酸虽不能直接进入 TCA 循环，但它们可经一系列酶促过程生成丙酮酸、乙酰—CoA、 α -酮戊二酸、延胡索酸、琥珀酰—CoA 等不同产物，从而再进入 TCA 循环氧化。各种氨基酸所形成的上述产物如图 11—15。

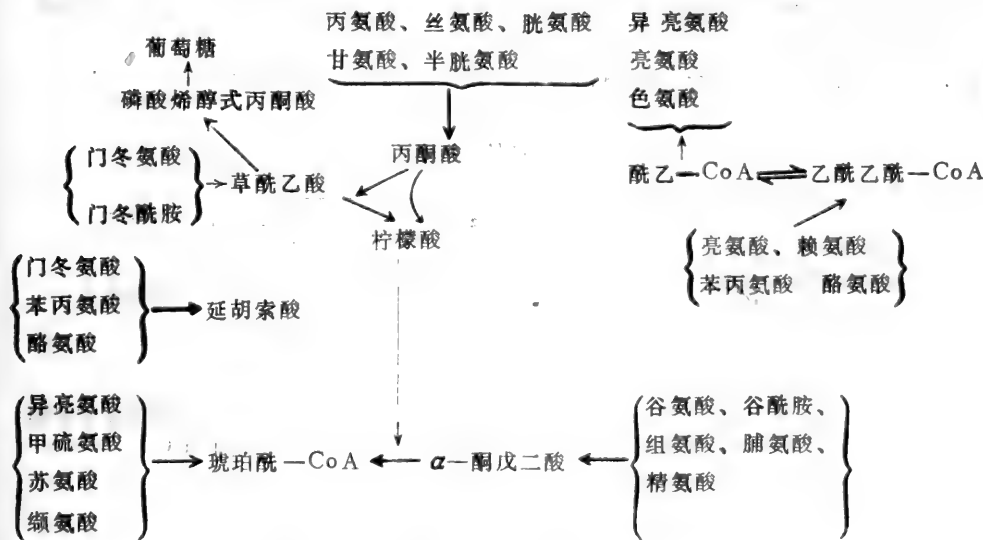
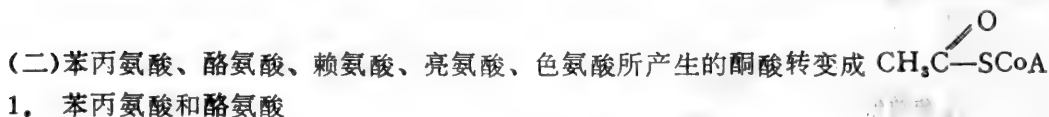


图 11—15 各种氨基酸的产物及相互转变

(一)丝氨酸、甘氨酸、半胱氨酸和胱氨酸等转变为 $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{COOH}$ 过程

丝氨酸在 L—丝氨酸脱水酶催化下脱水脱氨；半胱氨酸在半胱氨酸脱硫化氢酶催化下脱硫化氢脱氨形成丙酮酸已如上述（见氨基酸脱氨反应一节）。胱氨酸经还原形成半胱氨酸再脱硫化氢脱氨亦成丙酮酸。甘氨酸经丝氨酸转羟甲基酶催化，从 $\text{N}^6, \text{N}^{10}$ —甲叉—FH₄ 转一个羟甲基于甘氨酸的 α -碳上形成丝氨酸，然后丝氨酸再脱水脱氨成丙酮酸。此外苏氨酸在苏氨酸醛缩酶催化下



Phe \rightarrow Tyr \rightarrow HO-C6H4-CH2-C(=O)COO^- $\xrightarrow[\text{O}_2]{\text{对羟苯丙酮酸二加氧酶}}$ O=C1C=CC(=C(C=C1)O)C(=O)COO^- 尿黑酸

CH3-C(=O)-SCoA $\xrightarrow{\text{CoA 转氨酶}}$ CH3-C(=O)-COO^- $\xrightarrow{\text{乙酰 CoA 羧化酶}}$ CH3-C(=O)-CH2-COO^- $\xrightarrow{\text{柠檬酸合酶}}$ CH3-C(=O)-CH2-C(=O)-COO^- (TCA)

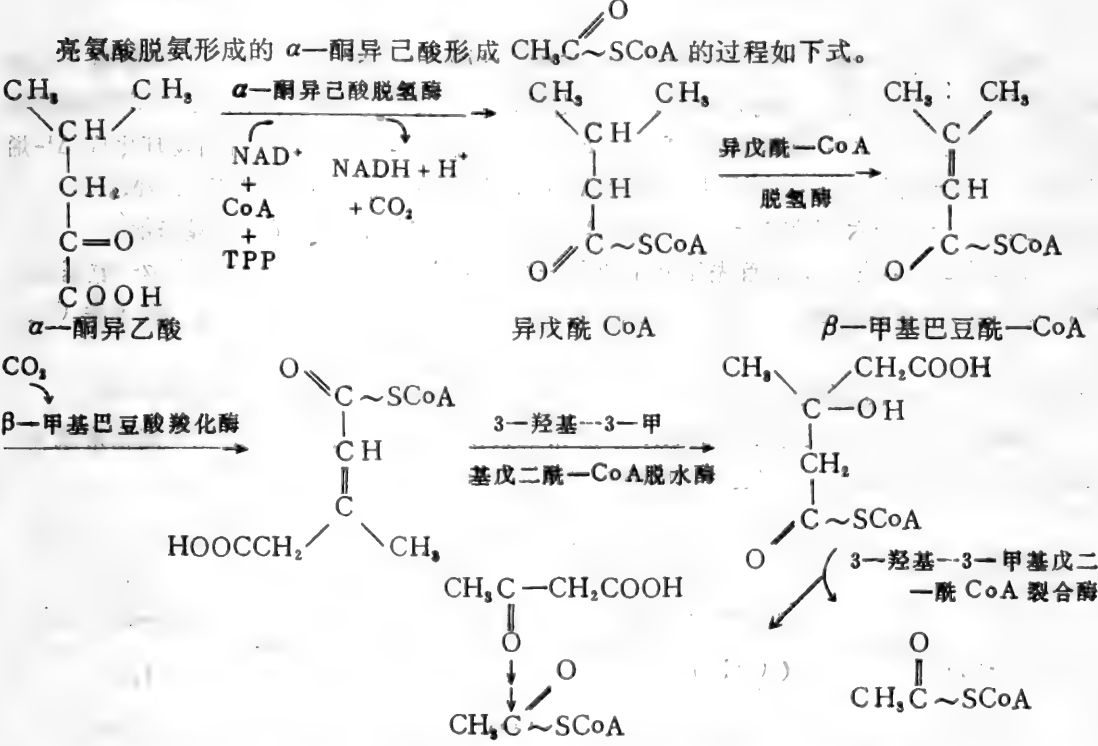
CH3-C(=O)-CH2-C(=O)-COO^- $\xrightarrow{\text{反丁烯二酸单酰乙酰乙酸水解酶}}$ CH3-C(=O)-CH2-C(=O)-CH2-COO^- (反丁烯二酸单酰乙酰乙酸)

CH3-C(=O)-CH2-C(=O)-CH2-COO^- $\xrightarrow[\text{GSH}]{\text{顺丁烯二酸单酰乙酰乙酸异构酶}}$ CH3-C(=O)-CH2-C(=O)-CH2-COO^- (顺丁烯二酸单酰乙酰乙酸)

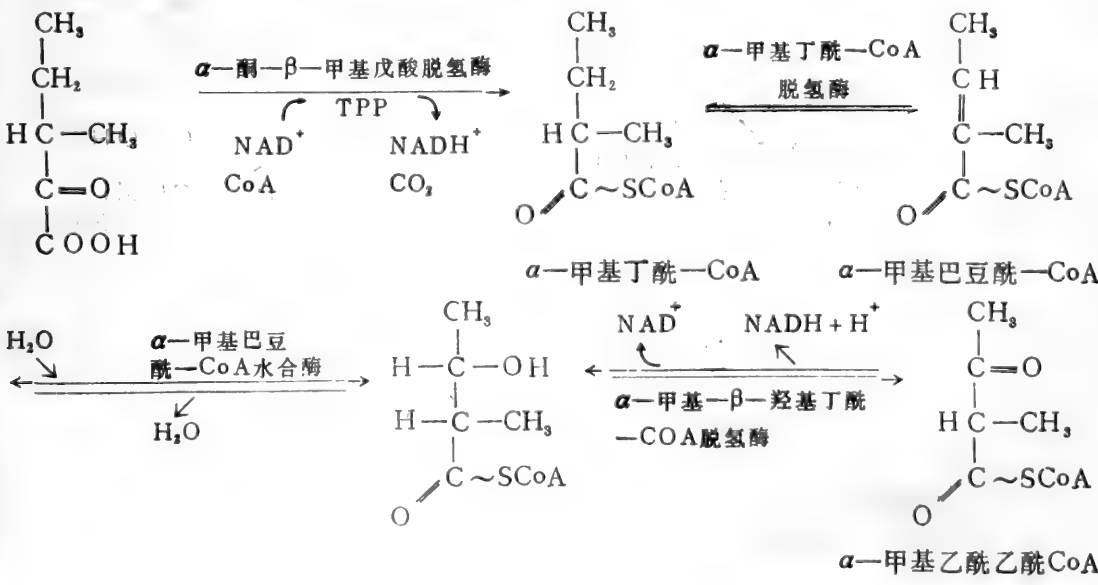
CH3-C(=O)-CH2-C(=O)-CH2-COO^- $\xrightarrow[\text{H}_2\text{O}]{\text{Fe}^{++}, \text{尿黑酸二加氧酶}}$ O=C1C=CC(=C(C=C1)O)C(=O)COO^- (尿黑酸)

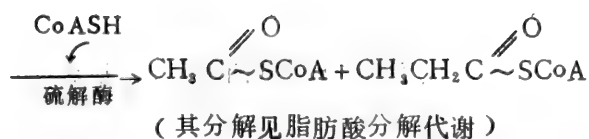
上式除生成 $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\sim\text{SCoA}$ 外还产生了反丁烯二酸（延胡索酸），该酸亦可进入 TCA 循环氧化。

2. 亮氨酸



异亮氨酸形成的 α -酮- β -甲基戊酸的分解的前几步同 α -酮异己酸，最后生成乙酰-CoA 和丙酰-CoA。如下式。





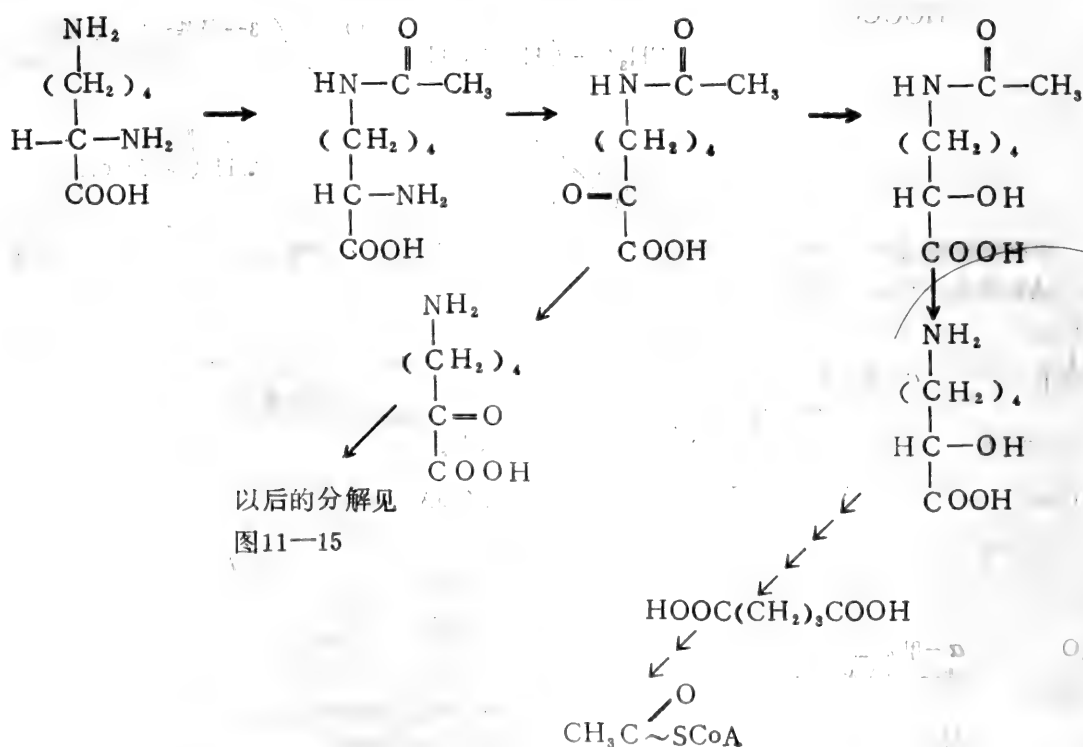
3. 赖氨酸

赖氨酸不进行转氨脱氨。在肝脏及其它组织的线粒体中，赖氨酸首先是形成真菌合成赖氨酸时所经过的中间物——酵母氨酸，然后由酵母氨酸直接途经 α -氨基己二酸 δ -半醛再继续分解。赖氨酸氧化脱氨而生成的酮酸 (ϵ -氨基- α -酮基己酸)，也可经自动环化成 Δ^1 -烯六氢吡啶-2-羧酸，再经需 NADH 或 NADPH 的还原酶加氢成六氢吡啶二羧酸，并氧化成 Δ^1 -烯-六氢吡啶-6-羧酸，然后再经 α -氨基己二酸- δ -半醛降解。

α -氨基己二酸半醛的降解首先是由肝脏中一个需吡啶核苷酸的酶氧化成为 α -氨基己二酸，然后再经转氨反应生成 α -酮己二酸，再经 α -酮己二酸脱氢酶系氧化成戊二酰单酰 CoA。

再经脱氢、脱羧成丁烯酰—CoA，最后生成 $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{SCoA}$ 。反应过程示如图11-16。

在哺乳动物组织中还存在赖氨酸分解的第二条途径。那是经 ϵ -乙酰化中间物形成 ϵ -乙酰氨基- α -酮基己酸的分解途径，反应可简单示如下式。



4. 色氨酸降解产物的分解代谢

色氨酸降解并不是首先脱氨成酮酸然后再分解，而是经许多步骤才脱去 NH_3 ，而生成一

[illegible]

图11-17 色氨酸的分解代谢途径

犬尿氨酸的羟化由犬尿氨酸3-单加氧酶催化，该酶需要 NADPH 和 O_2 。3-犬尿氨酸常以葡萄糖酸酯、O-硫酸酯和N- α -乙酰等形式的衍生物存在于哺乳动物尿中。有一种需磷酸吡哆醛的酶——犬尿氨酸酶，能催化犬尿氨酸和3-羟犬尿氨酸生成邻氨基苯甲酸和3-羟邻氨基苯甲酸。这两个酶促反应的另一产物为丙酮酸。3-羟犬尿氨酸裂解成丙氨酸的能力约为犬尿氨酸的二倍。

犬尿氨酸也能经转氨而使生成的相应的酮酸闭环成犬尿喹啉酸，然后脱水而成喹啉酸。

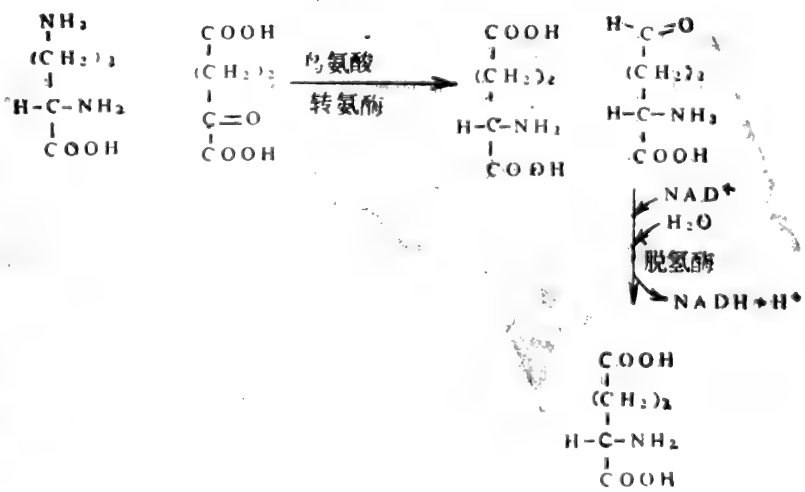
3-羟邻氨基苯甲酸的氧化是由存在于肝和肾线粒体中的3-羟邻氨基苯甲酸-3,4-二加氧酶催化的，该酶需 Fe^{++} 和一含-SH 的化合物。 O_2 可掺入产物中形成 α -氨基- β -羧基己二烯二酸- δ -半醛。此化合物是色氨酸分解的一个分枝点，它可以转变为吡啶-2,3-一二羧酸，然后与5-磷酸核糖-1-焦磷酸反应失去一个 CO_2 而成吡啶羧酸核苷酸。此反应由吡啶羧酸磷酸核糖基转移酶催化。此吡啶羧酸核苷酸用于 NAD^+ 的合成。 α -氨基- β -羧基己二烯二酸- δ -半醛可沿另一途径形成戊二酰-CoA，从而形成乙酰-CoA，也可脱羧接着环化成为吡啶二羧酸。整个反应总过程如图11-17。

(三)谷氨酸、谷酰胺、组氨酸、脯氨酸、精氨酸脱氨产物形成 α -酮戊二酸的分解代谢

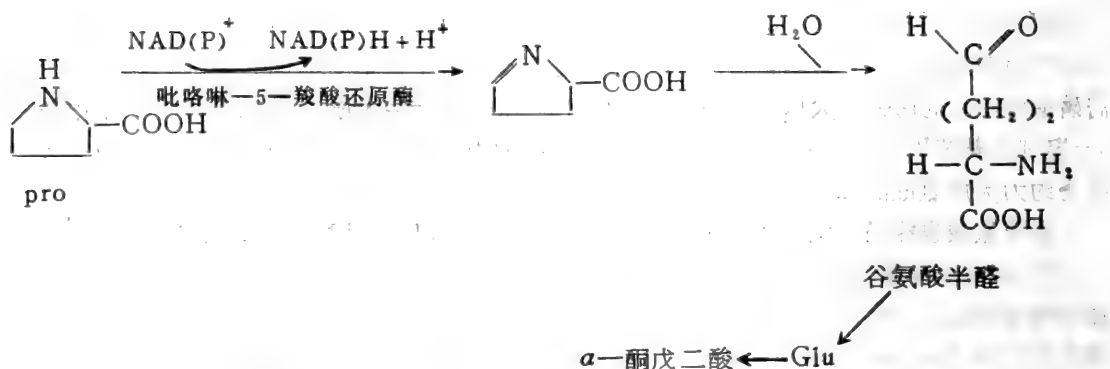
谷氨酸经谷氨酸脱氢酶催化形成 α -酮戊二酸的反应已如上述。谷酰胺、精氨酸、组氨酸、脯氨酸都可经一系列酶促反应形成谷氨酸，从而形成 α -酮戊二酸。

谷酰胺经过与 α -酮戊二酸转氨可直接形成谷氨酸，也可经谷氨酰胺酶水解产生谷氨酸和 NH_3 。这两过程已如前述。

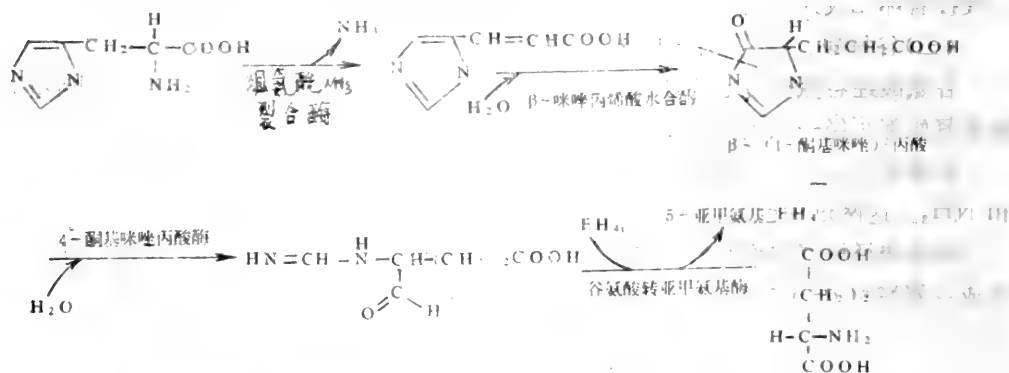
精氨酸经精氨酸酶水解成鸟氨酸和尿素，已如前述。鸟氨酸与 α -酮戊二酸转 $-NH_2$ 可生成谷氨酸和 α -氨基戊二酸半醛，它又可脱氢而成谷氨酸。反应如下：



脯氨酸在吡咯啉-5-羧酸还原酶催化下开环，即形成谷氨酸半醛，再转变为谷氨酸，从而形成 α -酮戊二酸。反应如下式：



组氨酸形成谷氨酸的过程较复杂，这里仅简单表示如下：



(四) 缬氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸

这几种氨基酸可脱氨生成酮酸，然后形成琥珀酰—CoA，进入 TCA 循环。整个反应过程示如图 11—18 和 11—19。

许多氨基酸的脱氨产物以及其它代谢产物最后都生成丙酮酸、 α -酮戊二酸、草酰乙酸、琥珀酰—CoA、延胡索酸等，这些产物都能进入三羧酸循环，最后转变为糖，这些氨基酸称为生糖氨基酸。如丙酮酸由 ATP 供能形成磷酸烯醇式丙酮酸，逆酵解途径而产生葡萄糖（见糖的分解代谢一节）。

α -酮戊二酸、延胡索酸和琥珀酰—CoA 则进入 TCA 循环生成草酰乙酸。在磷酸烯醇式丙酮酸激酶催化下，由 GTP 供能形成磷酸烯醇式丙酮酸，再逆糖解途径生成葡萄糖。

另外还有许多氨基酸的脱氨产物最后生成乙酰—CoA。乙酰—CoA 可形成酮体，所以凡是能形成乙酰—CoA 的氨基酸称为生酮氨基酸。

有些氨基酸的最后分解产物可生成 $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{COOH}$ 和 $\text{HOOCCH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{SCoA}$ ，又可生成乙酰—CoA，则称为生糖、生酮氨基酸。

各种生糖和生酮氨基酸可详见图 11—15。

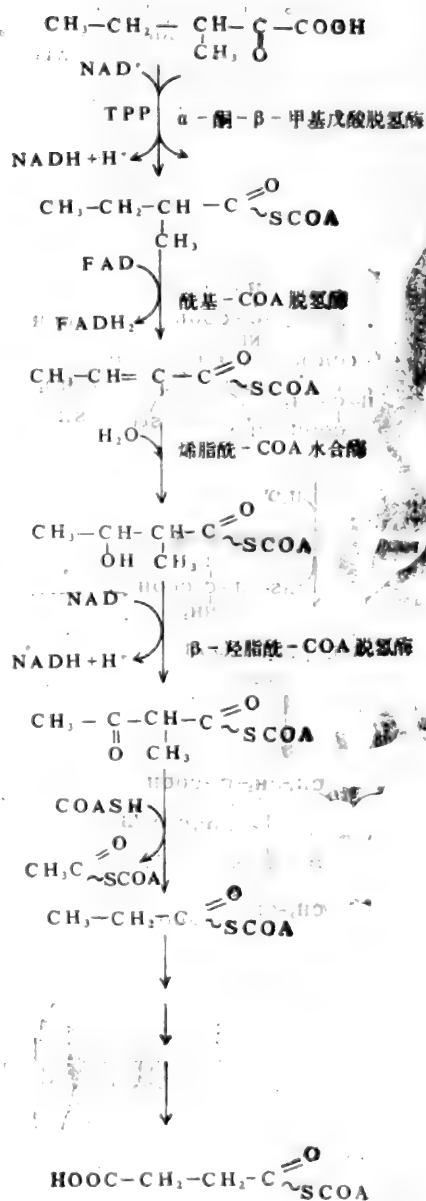
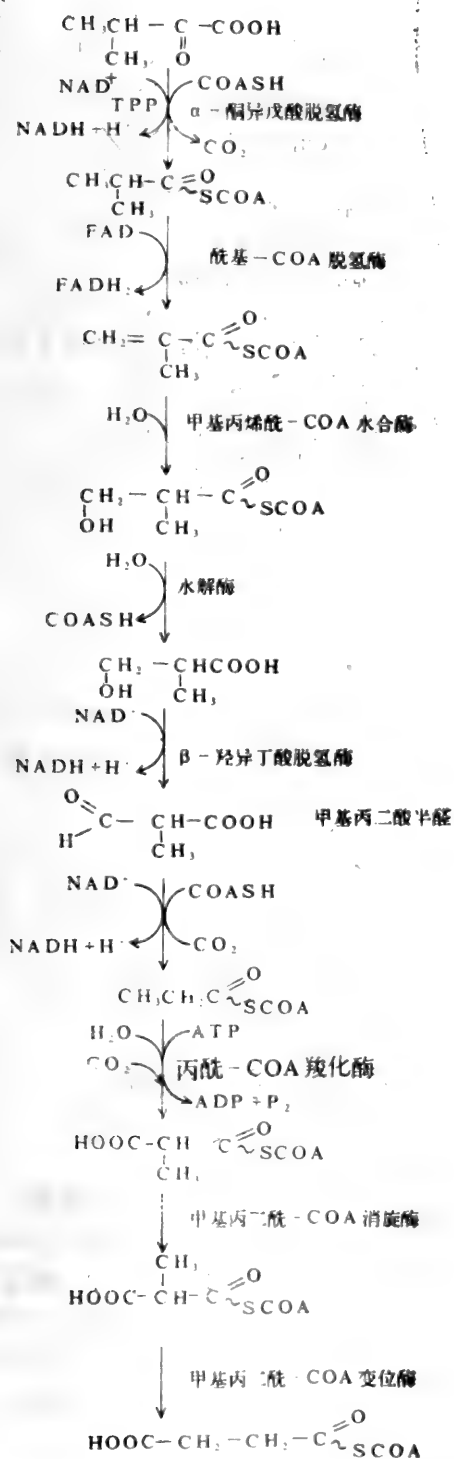
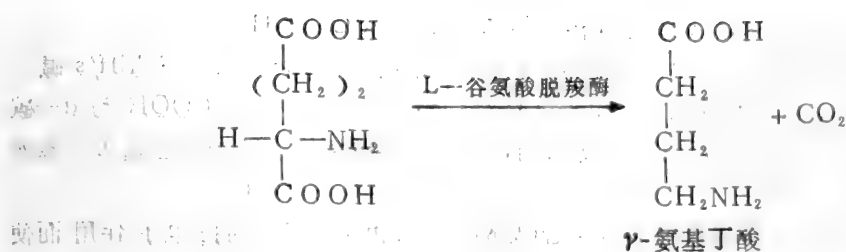
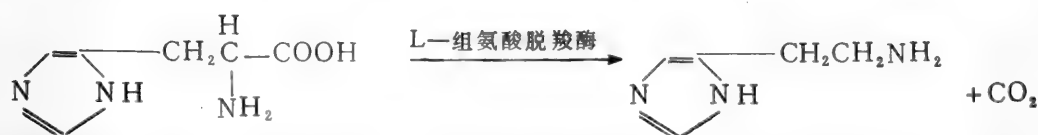


图11-18 由缬氨酸、异亮氨酸形成琥珀酰-CoA的过程

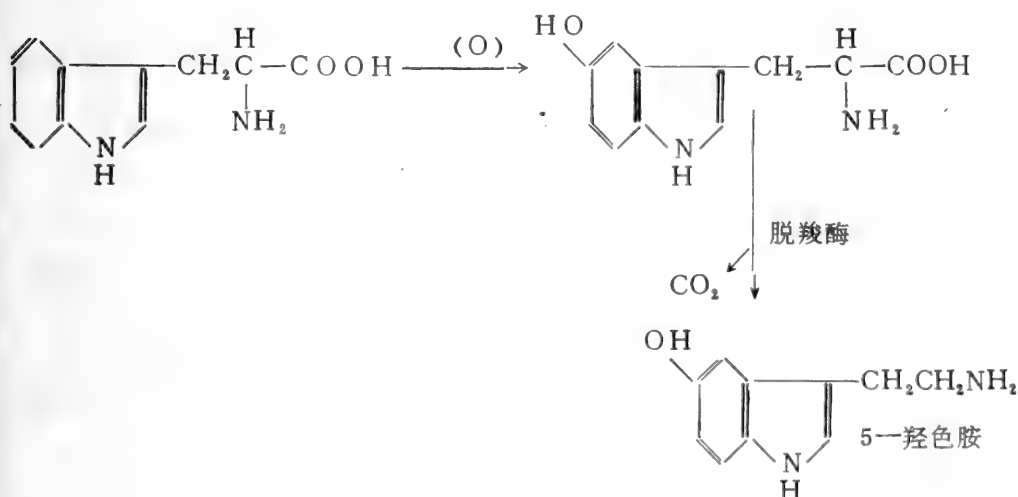


半胱氨酸脱羧形成的巯基乙胺可形成牛磺酸，在肝脏中与胆酸结合成牛磺胆酸，它为胆汁中的重要成分。

组氨酸在组氨酸脱羧酶催化下脱羧形成组胺。组胺在乳腺、肺、肝脏、肌肉、胃粘膜中含量较高，是强烈的血管舒张剂，因而可降低血压。但含量过高则会引起虚脱。创伤性休克或炎症病变部位，常有组胺释放。组胺还可促进胃粘膜分泌胃酸及蛋白酶。



色氨酸经氧化形成5-羟色氨酸，再在色氨酸脱羧酶作用下脱羧而成5-羟色胺，它与睡眠镇痛及体温调节等有关。



虽然有许多氨基酸的脱羧产物是生物活性物质，但大多数氨基酸的脱羧产物（胺类）对机体有毒害作用，必需在机体内迅速将其分解或转变成无毒物质。机体的这种作用称为生理解毒作用。

机体大多是通过氧化成醛而将胺类物质解毒，醛进一步脱氢氧化成有机酸。有机酸可经

β -氧化途径转变为乙酰-CoA，或通过柠檬酸循环被氧化成 CO_2 和 H_2O 。

氨基酸脱羧酶的脱羧机制首先是由氨基酸与酶的辅基磷酸吡哆醛结合成 Schiff's 碱，其作用与氨基酸脱水酶、转氨酶等相似。由于吡哆环的拉电子效应，使 $-\text{COOH}$ 与 α -碳原子间的键易于断裂而脱去 CO_2 ，组氨酸脱羧酶虽无磷酸吡哆醛辅基，但该酶蛋白N一端连结一个丙酮酰基，丙酮酰基与氨基酸的氨基结合(见酶一章)，由于 $-\text{C}-\overset{\text{O}}{\parallel}$ 的拉电子作用而使氨基酸易于脱羧。

第十二章 核苷酸代谢

生物体的各种代谢过程,大多都要有核苷酸参与,特别是各种三磷酸核苷酸(NTP)和三磷酸脱氧核苷酸(dNTP)。除了作为核酸生物合成必需的原料外,各核苷酸又有其独特功能。如UTP是多糖生物合成和糖类相互转变中主要的能源和转糖苷酶的辅酶,GTP在蛋白质生物合成中提供能源,CTP在磷脂生物合成中是形成活性中间物所必需的,ATP为各种代谢过程不可缺少的化合物,它不仅是合成许多维生素辅酶(如 NAD^+ 、 NADP^+ 、 FAD 、 CoA 等)的原料,而且是生物体能量累积、贮存、供应以及转换的主要形式。因此核苷酸代谢在整个代谢过程中至关重要。

第一节 核苷酸的生物合成

核苷酸可以从非核苷酸前体(如氨基酸、 CO_2 、 NH_3 等)从头合成,亦可从分解代谢形成的嘌呤碱或嘧啶碱合成。这后一种合成途径通常称为回收利用途径(salvage pathways)。回收利用并不意味着这个途径意义不大,在某种类型细胞中,这一途径确实还是核苷酸合成的主要途径。核苷酸的从头合成,在各种生物中都能进行,其合成主要分两个阶段进行。第一个阶段是合成单磷酸核苷酸母体—5'-IMP和5'-UMP。第二个阶段是经一系列转变合成各种单核苷酸或脱氧核苷酸以及各种多核苷酸及其衍生物。

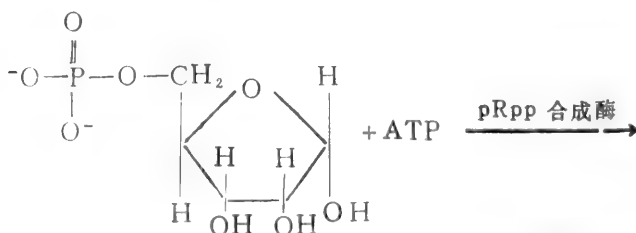
一、嘌呤核苷酸的从头合成

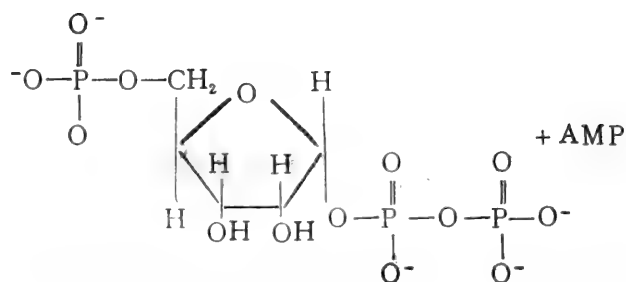
(一) 5'-一次黄嘌呤核苷酸的从头合成

在生物体内,次黄嘌呤核苷酸的合成又可分为两个阶段。首先是合成咪唑环,然后再合成整个嘌呤环。前者包括六个步骤,后者包括五个步骤,总共有十一个步骤。现介绍如下:

1. 5'-磷酸核糖-1-焦磷酸的合成

5'-磷酸核糖-1-焦磷酸(pRpp)的合成由5'-磷酸核糖-焦磷酸激酶(又称5'-磷酸核糖-焦磷酸合成酶)催化。该反应是由5'-磷酸核糖苷羟基上的氧亲核攻击的ATP的 β -磷原子。

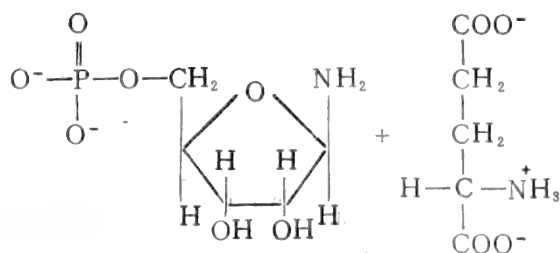
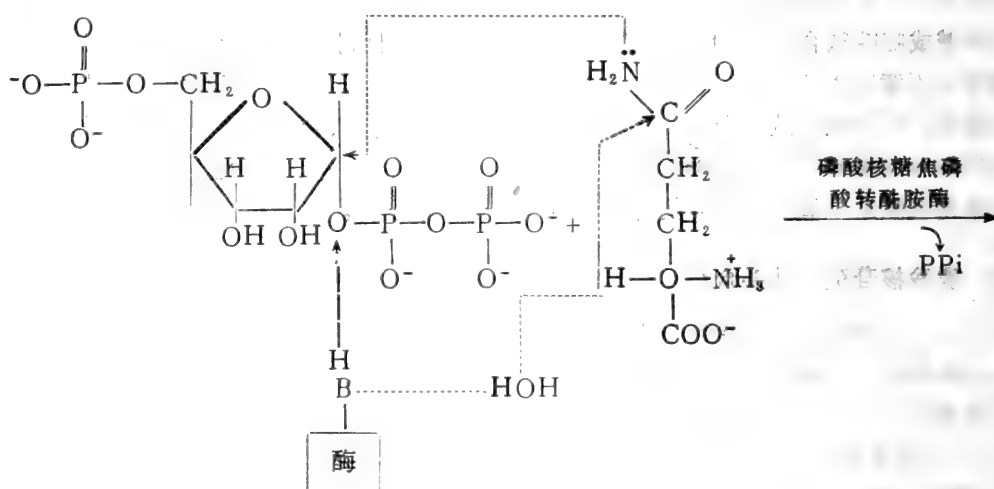




从人红细胞、鸟类肝脏和一些微生物中已分离出了催化此反应的酶。所得的酶多为聚合体，属别构酶类。有催化活性的酶分子量为700,000—1,200,000道尔顿。

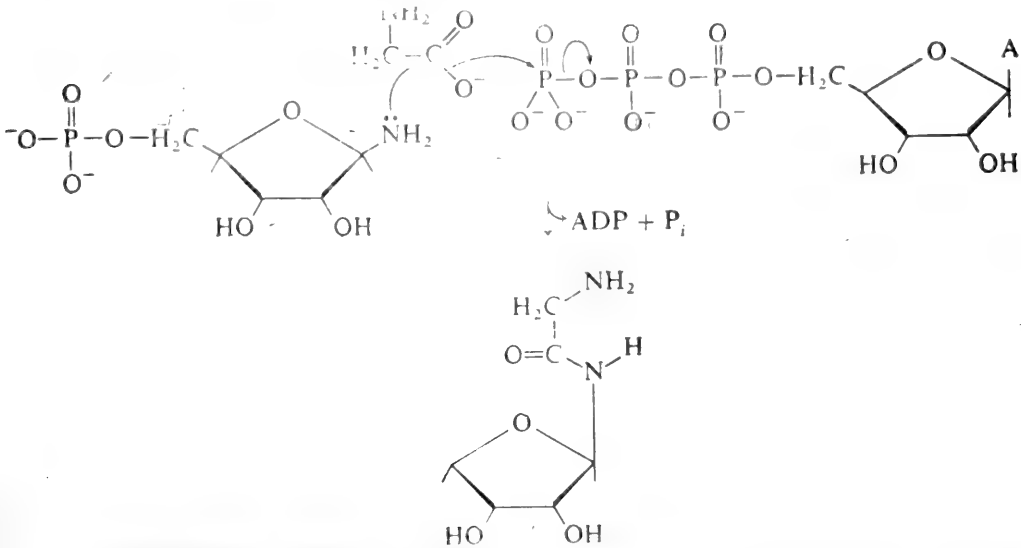
2. 由 pRPP 合成 5'-磷酸-β-D-核糖胺 (PRA)

这是装配嘌呤环的第一步。反应由磷酸核糖焦磷酸酰胺转移酶所催化。该酶广泛存在于人胎盘组织和淋巴母细胞、小白鼠脾脏、酵母和一些好氧细菌中。目前认为其反应机制是：酶上的某酸催化基团先给出一个 H⁺，使焦磷酸基团离去，而核糖 C-1 成为正碳离子；然后 γ-谷酰胺-NH₂ 基由原来焦磷酸的相反的方向 (β-方向) 亲核攻击 C-1 正碳离子，形成 PRA，并释放谷氨酸。反应如下式。



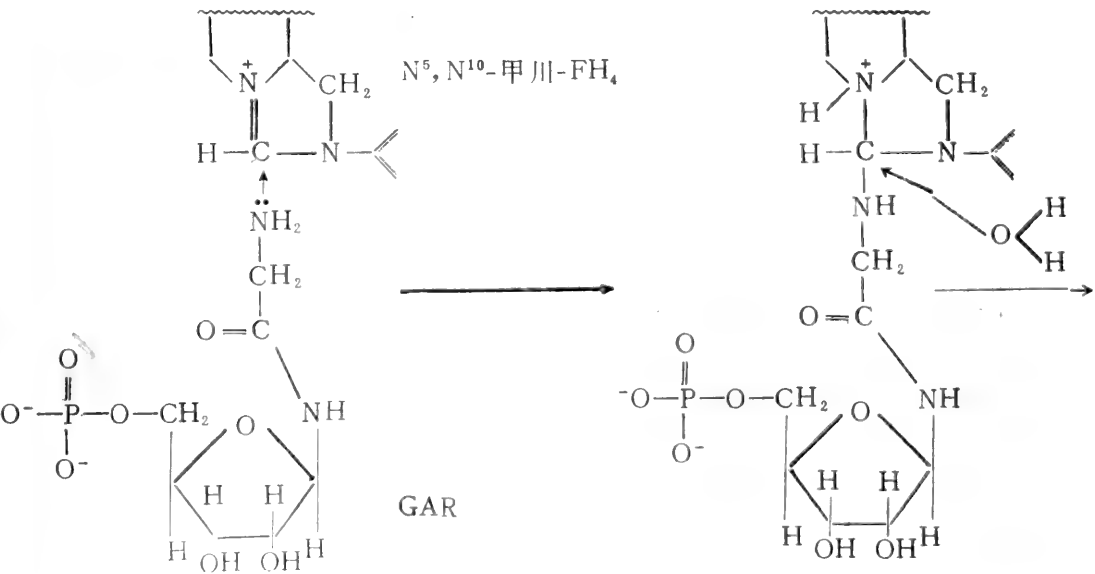
3. 5'磷酸核糖甘氨酸胺的合成

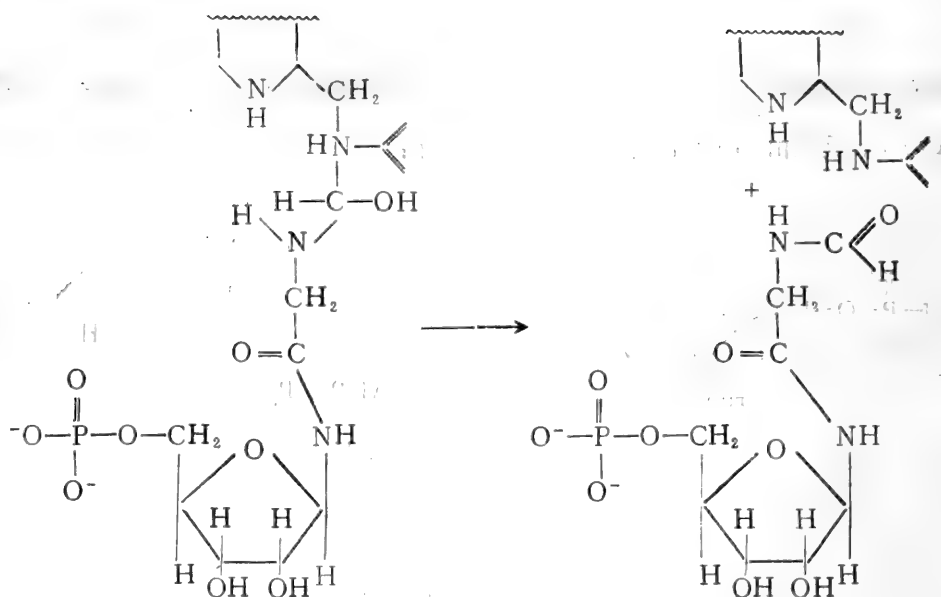
这一反应需要 ATP 供能，首先使甘氨酸活化成甘氨酸磷酸，然后再由 PRA 的 $-NH_2$ 亲核攻击甘氨酸的 $C=O$ 碳，形成 5'-磷酸核糖甘氨酸胺（又称甘氨酸胺-5'-核糖核苷酸（GAR））。反应由 GAR 合成酶催化，反应如下：



4. GAR 的甲酰化—甲酰-GAR 的合成

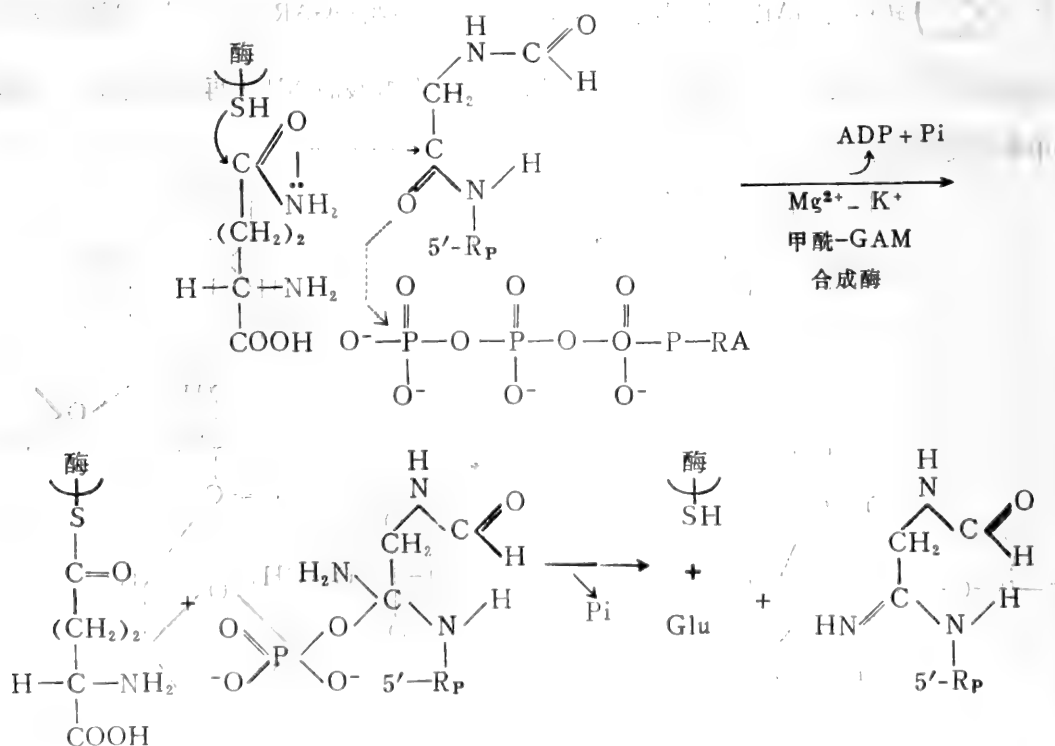
这步反应由 GAR 甲酰转移酶催化，以 N^5, N^{10} -甲川四氢叶酸为甲酰供体，把甲酰基（ $H-C \begin{smallmatrix} \nearrow O \\ \searrow \end{smallmatrix}$ ）转移到 GAR 的甘氨酸的 $-NH_2$ 上，形成甲酰-GAR。 N^5, N^{10} -四氢叶酸的甲川基是由被 ATP 活化的 $H-C \begin{smallmatrix} \nearrow O \\ \searrow \end{smallmatrix}$ 把甲酰基转移到四氢叶酸的 N^{10} 上再环化而成的。GAR 的甲酰化反应如下式：





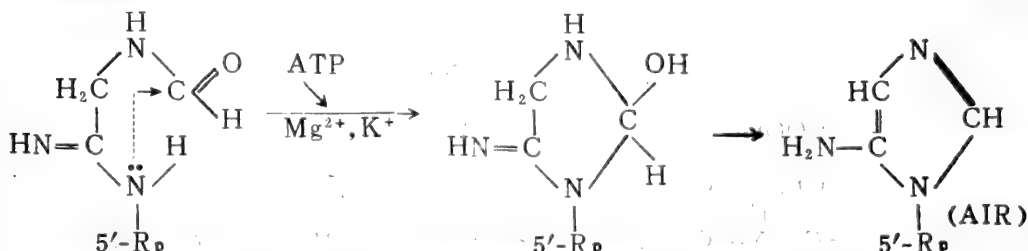
5. 甲酰甘氨酸-5'-核苷酸的合成

甲酰-GAR 是以 γ -谷酰胺为酰胺基供体，以 ATP 供能，由甲酰甘氨酸-5'-核苷酸合成酶 (GAM 合成酶) 催化而合成的，应反机制如下。催化该反应的酶已分离，其 $M \cdot W = 133,000$ 。



6. 5-氨基咪唑-5'-核苷酸的合成

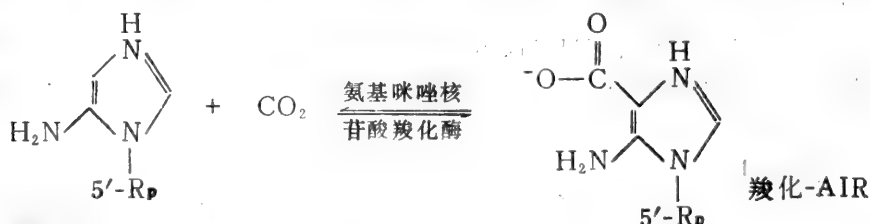
GAM 的甲酰基被 ATP 活化后在氨基咪唑核苷酸合成酶催化下，闭环形成5-氨基咪唑-5'-核苷酸 (AIR)。反应如下式



以上是装配咪唑环的六个反应，下面介绍嘌呤环装配过程中的五个反应

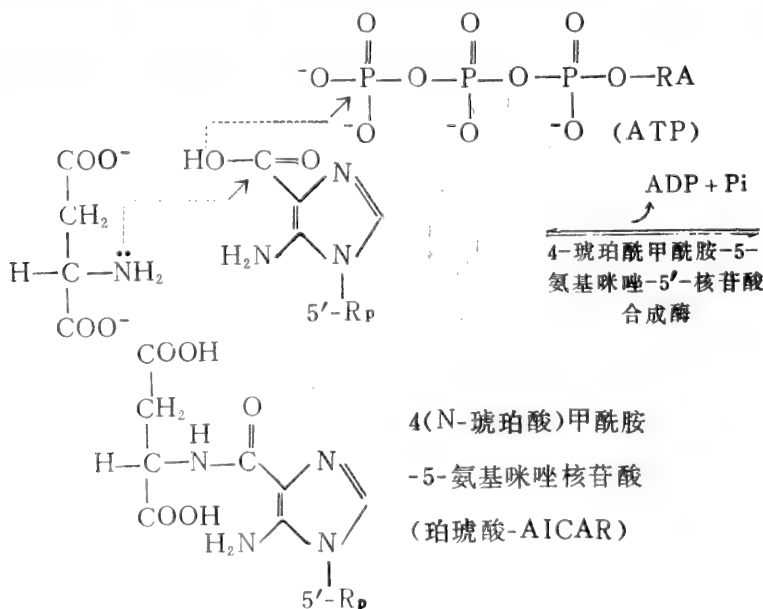
7. AIR 的羧化

AIR 在 AIR-羧化酶催化下，被 CO_2 羧化形成羧化-AIR，即5-氨基-4-咪唑羧酸-5'-核苷酸。反应如下：



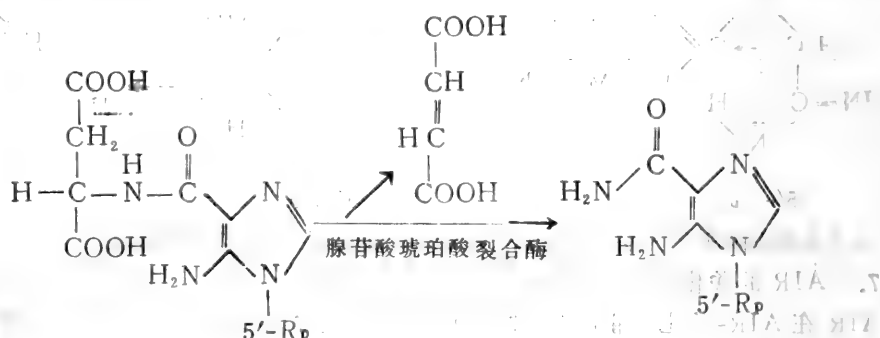
8. 4-琥珀酸甲酰胺-5-氨基咪唑-5'-核苷酸的形成

嘌呤核苷酸嘌呤环的最后一个 N-原子是由门冬氨酸的 $-NH_2$ 提供的。羧化-AIR 上的 4-位- $COOH$ 被 ATP 活化后，旋即与天冬氨酸的 $-NH_2$ 形酰胺键。这个反应与第 3 步反应类似，由 4-琥珀酸甲酰胺-5-氨基咪唑-5'-核苷酸合成酶催化。如下式：



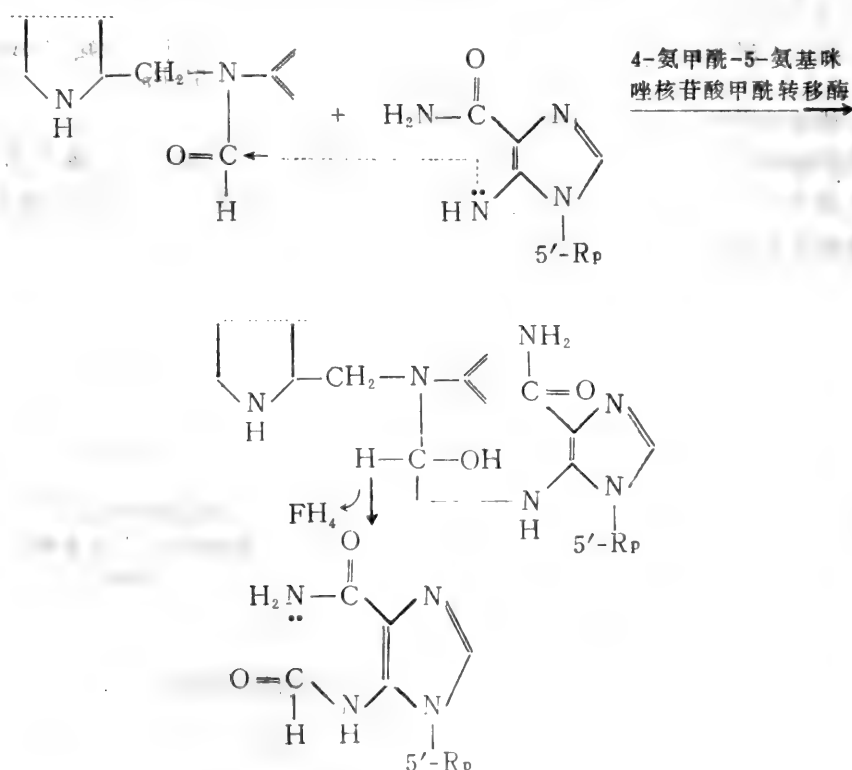
9. 4-氨甲酰-5-氨基咪唑核苷酸的合成

琥珀酸-AICAR 消去一个反丁烯二酸即成为4-氨甲酰-5-氨基咪唑核苷酸。催化这个反应的酶也能使腺苷酸-琥珀酸裂解成 AMP 和反丁烯二酸，故名为腺苷酸琥珀酸裂合酶。反应如下：



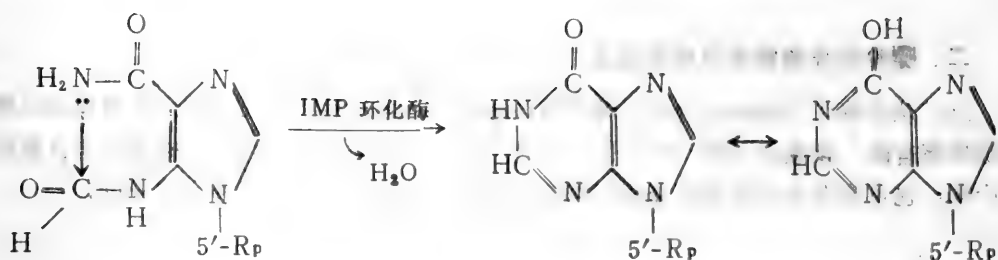
10. 4-氨甲酰-5-氨基咪唑核苷酸的甲酰化

经以上九步，离完成嘌呤环只差该环的C-2一个原子了。以 N^{10} -甲酰-FH₄ 为甲酰供体，在4-氨甲酰-5-氨基咪唑核苷酸甲酰转移酶催化下，即可成完此甲酰化反应。反应如下式：



11. 嘌呤环的形成

4-氨甲酰-5-氨基咪唑甲酰化后，立即在-环化酶催化下，环化形成 IMP。反应下式；

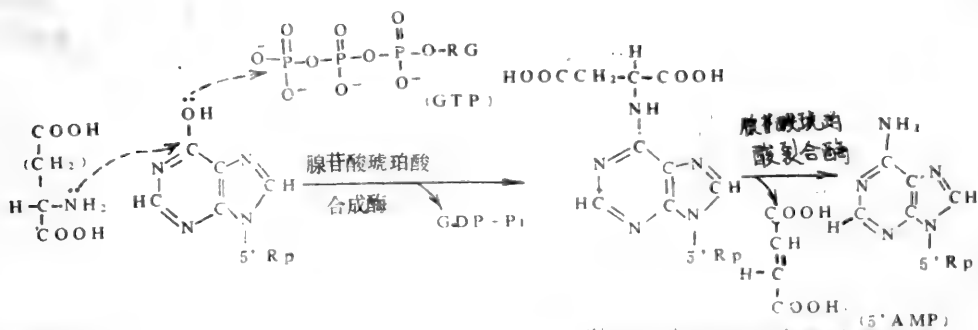


(二) 其它嘌呤核苷酸的合成

IMP 是各种嘌呤核苷酸的母体，在这母体嘌呤环上引入各种基团，即得各种嘌呤核苷酸。

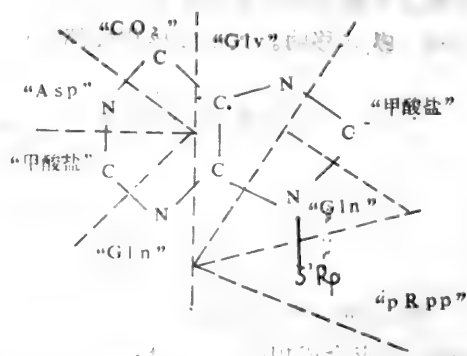
1. 腺嘌呤核苷酸—5'-AMP 的合成

在5'-IMP 的6-OH 引入一个-NH₂ 来取代-OH 即可得5'-AMP。这一反应由门冬氨酸作-NH₂ 供体，由GTP 水解供能，经两个酶，分两步进行。首先由腺苷酸琥珀酸合成酶催化合成腺苷酸琥珀酸，旋即在腺苷酸琥珀酸裂合酶催化下，释放一个反丁烯二酸而生成 AMP。反应如下式：



2. 鸟嘌呤核苷酸—5'-GMP 的合成

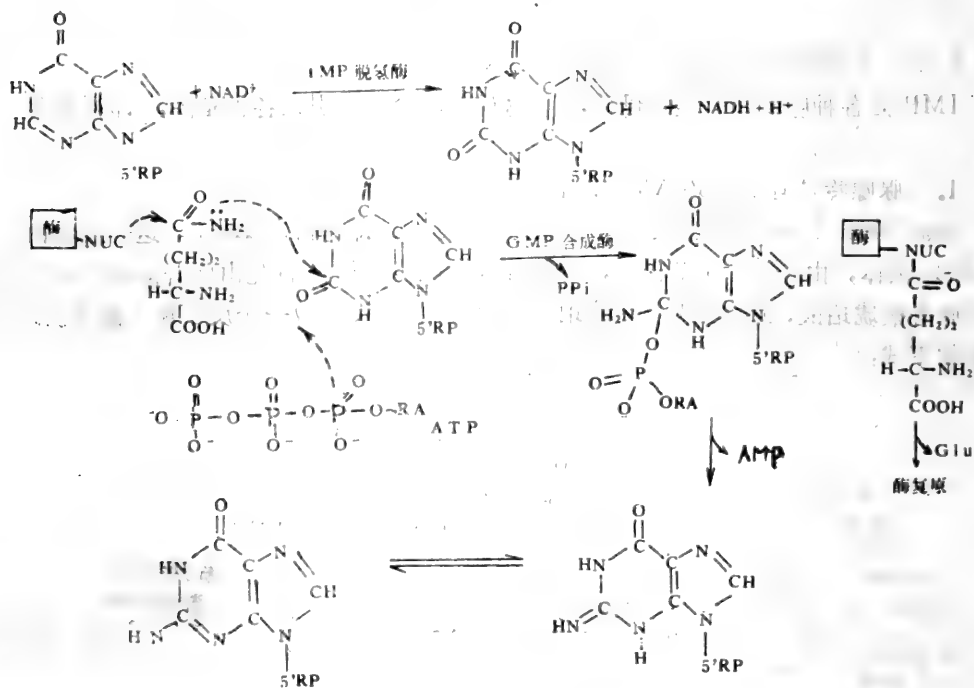
在5'-IMP 2-位引入一个-NH₂ 即得 5'-GMP。其步骤是：首先在5'-IMP 脱氢酶催化下使5'-IMP 氧化成5'-黄嘌呤核苷酸 (5'-XMP)。然后由 ATP 供能以 γ -谷酰胺的酰胺基 (动物) 或 NH₃ (细菌) 作为-NH₂ 供体，鸟苷酸合成酶催化，把-NH₂ 引到5'-XMP 的C-2上生成5'-GMP。反应见第540页。



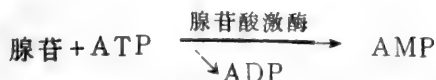
以上述嘌呤核苷酸的生物合成都是由一些简单化合物逐渐装配成嘌呤环和环上的侧链。所以称这种合成方式为嘌呤核苷酸的从头合成。嘌呤环中各原子的来源可总结如下式，这已由同位素实验证实。

二、嘌呤核苷酸的回收利用途径

除了从简单化合物从头合成各种嘌呤核苷酸外，各种生物可回收利用体内现成的嘌呤碱或嘧啶核苷酸（核酸的分解产物）以合成各种嘌呤核苷酸。这些现成的材料可来自食物的消化产物，也可来自体内核酸的降解产物。回收利用合成途径可以两种方式进行。

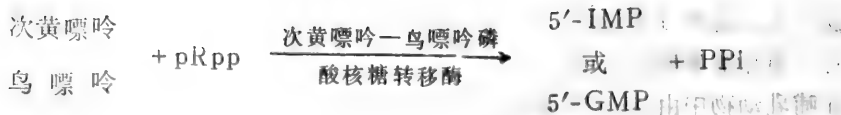


一种是先在嘌呤核苷磷酸化酶催化下，嘌呤碱与 α -D-核糖-1-P 反应生成嘌呤核苷。然后再在某嘌呤核苷激酶催化下与 ATP 反应成为核苷酸。催化这个反应的激酶又称 ATP:腺苷-5'-P 转移酶。大部分核苷酸都能在激酶催化下合成。



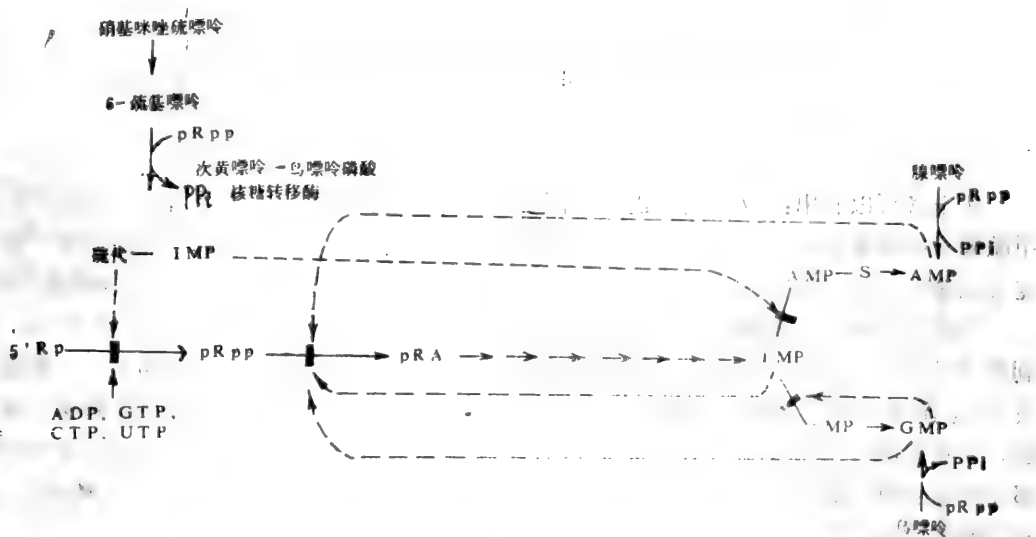
第二种回收利用途径是在磷酸核糖转移酶或核苷酸焦磷酸化酶催化下，使嘌呤碱与 pRpp 反应合成相应的嘌呤核苷酸。例如：





三、嘌呤核苷酸合成的调节

在生物体内嘌呤核苷酸生物合成都具有精细的调节控制机制。如 AMP 和 GMP 的合成过多，则它们即对催化反应 $\text{pRpp} \rightarrow \text{PRA}$ 的磷酸核糖焦磷酸酰胺转移酶起反馈抑制作用。从而抑制 AMP 或 GMP 的继续形式。在有些生物系统中，过多的 AMP，可反馈抑制 $\text{IMP} \rightarrow \text{AMP}$ 反应中的 4-琥珀酸甲酰氨-5-氨基咪唑-5'-核苷酸合成酶。而在另一些生物体中，过多的 GMP 可反馈抑制 $\text{IMP} \rightarrow \text{XMP}$ 反应中的 IMP-脱氢酶，从而降低 GMP 的合成。此外，GMP 从是 IMP 合成 AMP 的必需辅助因子。嘌呤核苷酸合成途径中的大部分酶，都能被嘌呤碱、嘌呤核苷和嘌呤核苷酸所抑制。这些调节机制总结如下式：



有些药物如6-巯基嘌呤和硝基咪唑硫嘌呤等可用作免疫抑制剂或癌干扰剂。其作用是由于硝基咪唑硫嘌呤可转变为6-巯基嘌呤，而6-巯基嘌呤又可在次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶催化下形成相应的硫代-IMP。这个IMP类似物可和IMP一样抑制pRpp转变为PRA，从而抑制正常嘌呤核苷酸的生物合成。从而抑制癌细胞的生长。硝基咪唑硫嘌呤之所以能治疗痛风也同样是因它能抑制嘌呤核苷酸的合成。

四、嘧啶核苷酸的从头合成

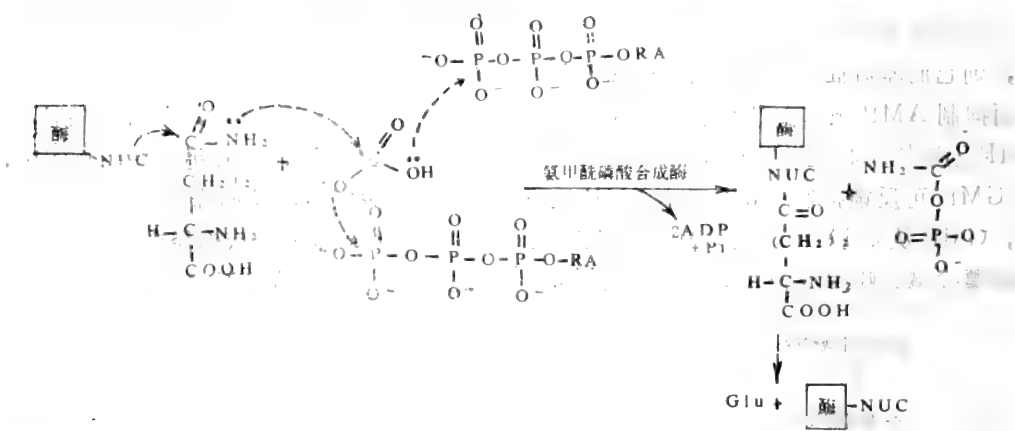
嘧啶核苷酸的从头合成与嘌呤核苷酸不同。嘌呤核苷酸的从头合成是在pRpp上逐步参入各原子而生成嘌呤环。而嘧啶核苷酸的合成则是先装配一个嘧啶衍生物——乳清酸，然后再使这嘧啶衍生物与pRpp反应，最后方成为嘧啶核苷酸母体UMP。然后再引入各基团而成不同的嘧啶核苷酸。

(一) UMP的从头合成

这一合成过程分两阶段。第一阶段是形成嘧啶环；第二阶段合成嘧啶核苷酸。

1. 氨甲酰磷酸的合成

在哺乳动物中由 γ -谷酰胺提供酰胺基, 由 ATP 供能, 由需谷酰胺的氨甲酰磷酸合成酶催化, 使碳酸氢盐氨基化而合成氨甲酰磷酸反应如下式:

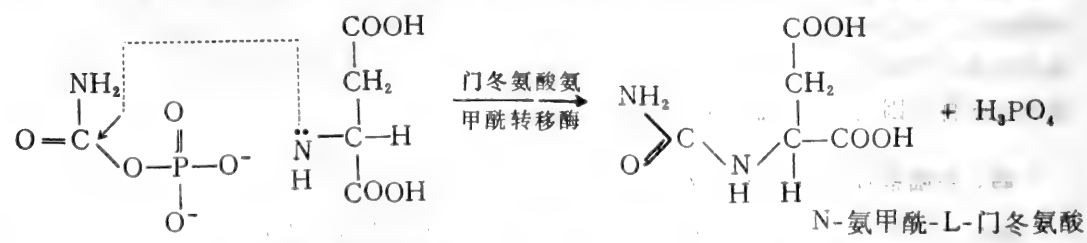


从上式可以看出: 这个反应需要有两个 ATP 分子参与反应。一个 ATP 供能以形成氨甲酰磷酸中的酰胺键, 另一个则为氨甲酰磷酸提供一个磷酸基团。催化这个反应的酶一般与嘧啶合成途径中第二个和第三个酶构成一个多功能的多酶复合体(M. W. = 210,000道尔顿)。

在微生物如大肠杆菌中, 氨甲酰磷酸合成酶复合体可以利用 γ -谷酰胺的酰胺 N, 也可利用 NH₃ 作为 -NH₂ 供体。该酶有两个亚基 (M·W 为 130,000 和 40,000)。大亚基只有当 NH₃ 作为 -NH₂ 供体时才起作用, 而以 γ -谷酰胺作 -NH₂ 供体时则由小亚基执行催化功能, 大亚基除了具有合成的氨甲酰磷酸催化中心外, 还含有终产物 UMP 反馈抑制剂的结合部位和激活剂鸟氨酸及 NH₃ 的结合部位。而激活剂是负责把氨甲酰磷酸合成精氨酸, 这样就可使氨甲酰磷酸在合成 UMP 和精氨酸两方面得以合理分配。

2. N-氨甲酰-L-门冬酸的合成

这是由氨甲酰磷酸转移一个氨甲酰基于门冬氨酸的 -NH₂ 上而合成的。反应如下式:



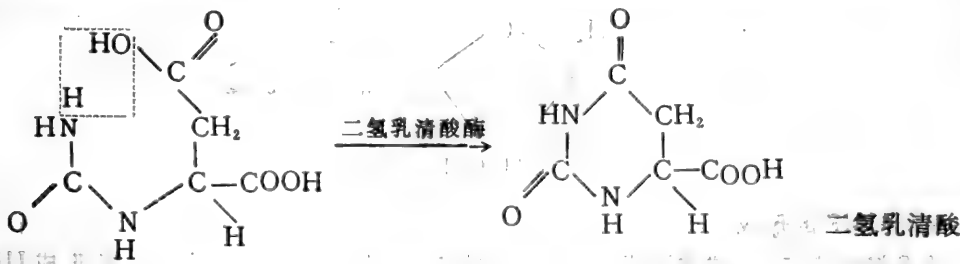
在哺乳动物中门冬氨酸氨甲酰转移酶(ATcase)与第一步的氨甲酰磷酸合成酶和下一步的二氢乳清酸酶形成 M·W = 210,000道尔顿的多酶复合体。

在微生物中 ATcase 与哺乳动物细胞中的 ATcase 显然不同。大肠杆菌中分离出来的该种酶的 M·W = 300,000 道尔顿, 它由两种不同类型亚基构成, 这已在第六章介绍, 它由

两个三聚体催化亚基和三个二聚体调节亚基构成。前者催化 N-氨甲酰门冬氨酸的合成;后者不显催化活性,但具有嘧啶合成的终产物 CTP 的结合部位,也能结合 ATP,但结合后发生的效应不同。结合前者则抑制氨甲酰门冬氨酸的合成。而结合后者则刺激合成。该酶详细特性见第六章别构酶一节。

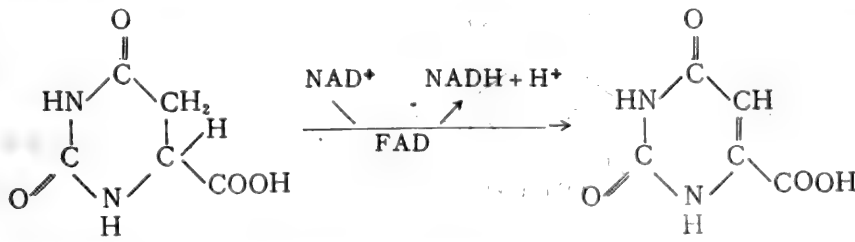
3. 氨甲酰门冬酸环化形成二氢乳清酸

在多酶复合体上的二氢乳清酸酶催化下,氨甲酰门冬酸即环化形成5,6-二氢乳清酸,并消去一分子水,反应如下式:



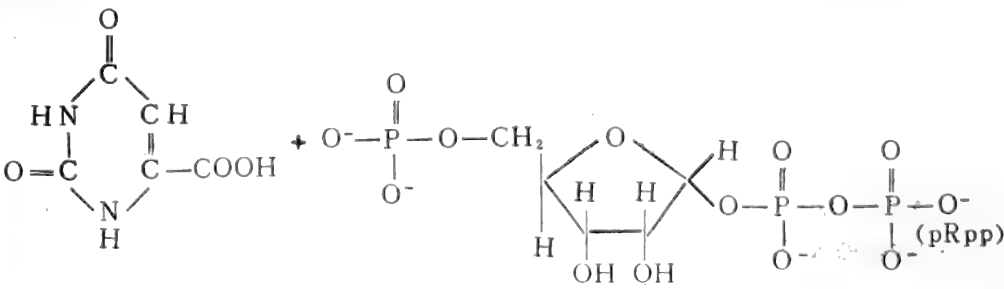
4. 嘧啶环的形成

在二氢乳清酸脱氢酶催化下,二氢乳清酸的5,6-碳原子上各脱一个氢形成乳清酸。这时嘧啶环即形成。在哺乳类细胞中,催化此反的酶位于线粒体中,是含铁的黄素蛋白。在以 O_2 为氢受体时,经 O_2 而形成 H_2O_2 。也可以 NAD^+ 作电子受体,使 NAD^+ 还原成 $NADH$ 。反应如下式:

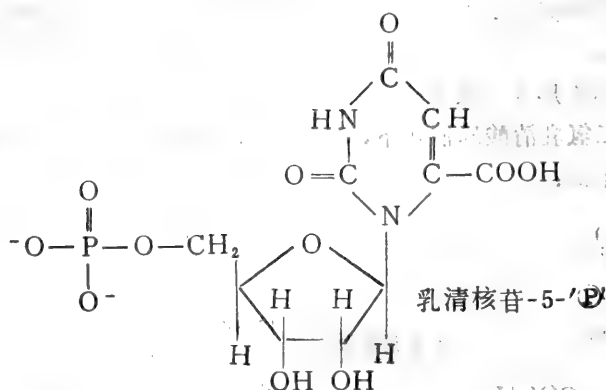


5. 乳清核苷酸的形成

带嘧啶环的乳清酸,在乳清酸核糖基转移酶催化下,从 pRpp 接受一个 5'-Rp 即形成乳清苷-5'-磷酸(OMP)。由于反应中有 PP_i 生成,故该酶又名乳清核苷酸焦磷酸化酶。反应如下式。

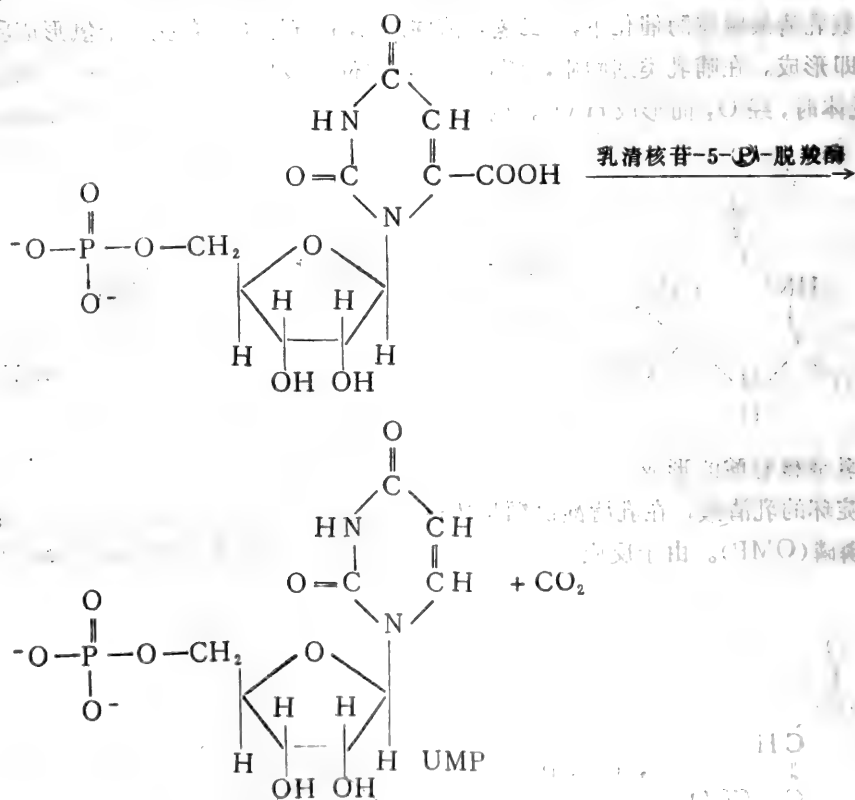


乳清酸磷酸核糖转移酶, 在 Mg^{2+} 存在下, 将乳清酸与核糖-5-磷酸反应, 生成乳清核苷-5'-P_i 和无机磷酸 (PPi)。



16. UMP 的形成

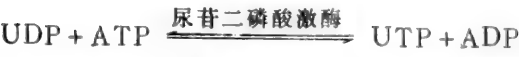
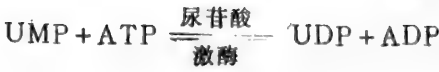
在乳清核苷-5'-P_i 脱羧酶催化下, 从乳清核苷-5'-P_i 脱去一个 CO_2 , 即形成 UMP。反应如下式:



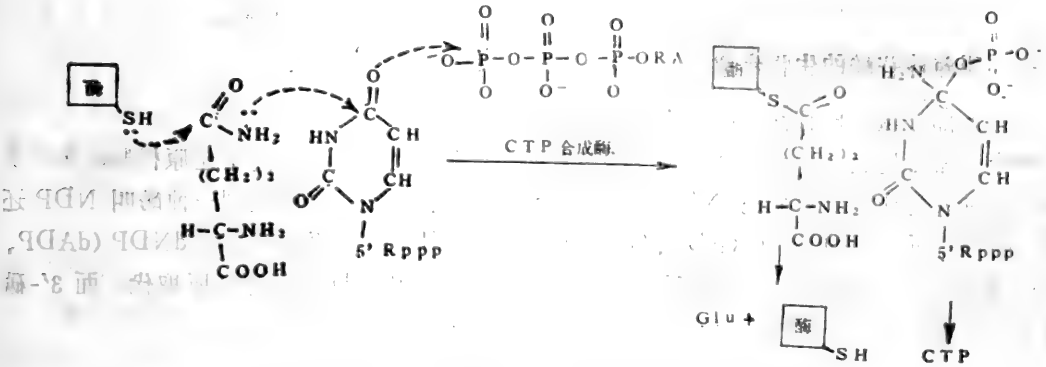
(二) CMP 的合成

合成的嘧啶母体 UMP 不能直接氨基化而生成 CMP。嘧啶环的氨基化必需在 UTP 水平上才能进行。因此上面从头合成的 CMP 首先要在核苷-磷酸和核苷二磷酸激酶催化下形

成 UTP。即：



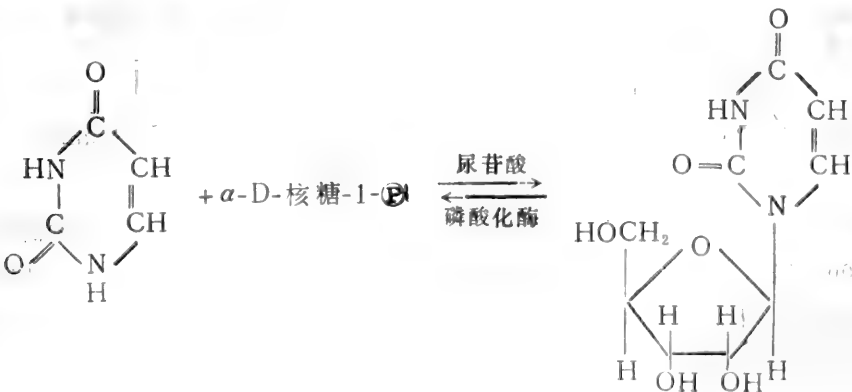
UTP 的氨基化由 CTP 合成酶催化。在大肠杆菌中，此酶的活性在以 γ -谷酰胺作为 $-\text{NH}_2$ 供体时优于 NH_3 作为 $-\text{NH}_2$ 供体，而在哺乳动物中则只能以前者为 $-\text{NH}_2$ 供体。从鼠、牛肝分离的酶的活性部位有一个活性 $-\text{SH}$ 。反应机制如下式。



CTP 合成酶的活性可被 GTP 所刺激。GTP 的作用是它可促进酶-谷氨酰中间物的形成，从而促进谷酰胺的 $-\text{NH}_2$ 被利用。

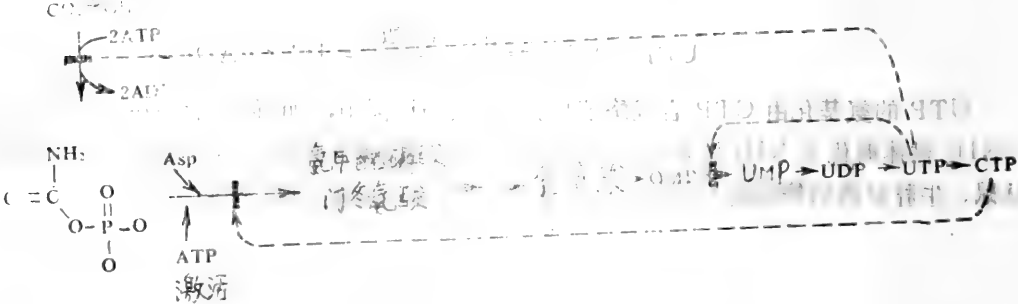
五、嘧啶核苷酸的回收利用途径

生物体的外源嘧啶碱或其核苷，以及分解代谢产生的嘧啶碱或其核苷也和嘌呤碱及其核苷一样，可回收利用以合成体内需要的核苷酸。但嘧啶核苷酸的回收利用途径与嘌呤不同。前者主要靠嘧啶核苷酸激酶而不是靠磷酸核糖转移酶。如尿嘧啶和尿苷的回收利用如下式。但亦可由磷酸核糖转移酶催化合成。



六、嘧啶核苷酸合成的调节

在真核细胞中，嘧啶的生物合成亦有精密的调控机制，可示如下式：



七、脱氧核苷酸的生物合成

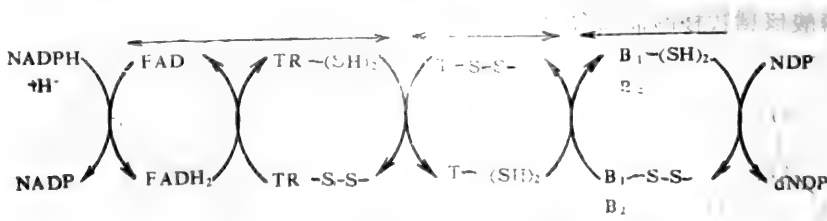
(一)大部分脱氧核苷酸的生物合成

嘌呤和嘧啶脱氧核苷酸是由相应核糖核苷酸的糖组分还原而成。这个还原机制的第一次阐明是通过大肠杆菌提取液把 NDP 还原成 dNDP 而开始的。当时找到一种酶叫 NDP 还原酶，能催化所有四种 NDP (ADP、GDP、CDP 和 UDP) 还原成相应的 dNDP (dADP、dGDP、dCDP 和 dUDP)。在这些反应中，NDP 的核糖 2'-OH 为氢原子所取代，而 3'-碳原子上的基团不变。反应为：



在这还原反应中，还原力的直接来源是酶分子上的一对 -SH。它在氧化成 -S-S- 后，又可被第二个酶恢复原状。这种复原作用有几种酶参与，一种叫硫氧还蛋白，其分子量为 12,000，是一种热稳定蛋白，它也含有两个 -SH，可氧化成 -S-S-。硫氧还蛋白恢复其还原型，是通过 NADPH 和硫氧还蛋白还原酶实现的。这个还原酶是一个黄素蛋白，每克分子酶含有两克分子 FAD。第二个氢供体是还原型谷胱甘肽，它在有热稳定蛋白——谷胱甘肽还原酶存在下起作用，氧化了的谷胱甘肽，则被 NADPH—谷胱甘肽还原酶重新恢复成活泼的还原态。

从 NADPH 到 NDP 的还原所经的电子传递链示如下式：



大肠杆菌 NDP 还原酶含有两个亚基 B₁ 和 B₂。B₁ 由两个分子量相同的肽链构成，其分子量为 160,000 道尔顿，每个肽链含有一个底物结合部位，以及两种效应剂结合部位。两种效应剂的结合部位，一个具有底物专一性，而另一个则调节总的催化效率。B₁ 也含有一 -SH，这是它呈现活性所必需的。B₂ 蛋白分子量为 78,000 道尔顿，也是由两条相同肽链构成，它含有两个非血红素铁原子和一个 Tyr 残基芳香环上的邻域有机自由基。NDP 还原酶的抑制

剂——羟基脲，就是通过使自由基失活而起抑制作用的。

NDP 还原酶的催化部位由 B₁ 和 B₂ 所构成。B₁ 贡献一SH 还原力和底物结合部位。B₂ 是自由基的源泉。酶结构如图12-1。

NDP 还原酶活性受 NTP 别构调节，有些 NTP 作为激活剂，而其它则作为抑制剂。例如 CDP 和 UDP 还原酶强烈地受 ATP 刺激，而 ADP 和 GDP 还原酶则受 GTP 和 dTTP 刺激。dATP 则能抑制所有 NDP 的还原。大肠杆菌 NDP 还原酶模型如图12-1。

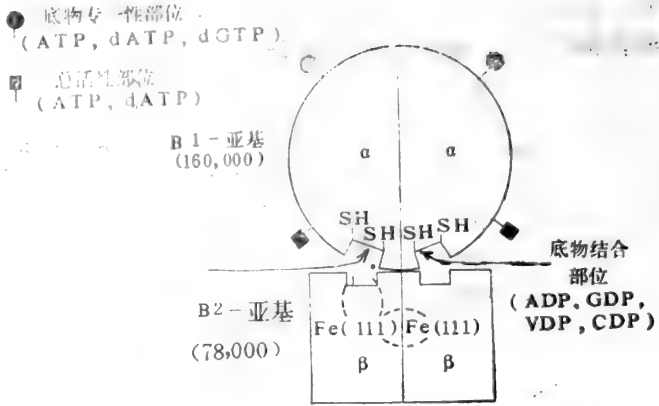


图12-1 大肠杆菌 NDP 还原酶的模型

该酶总的效应剂和抑制剂系统，可均衡供应 DNA 合成的底物 dNTP。类似于大肠杆菌的 NDP 还原酶已在各种动物细胞中分离获得。但在一些乳酸菌中也找到了不同的 NDP 还原酶，它们只有一单肽链（MW = 76,000 道尔顿）。其主要性质为：①其优先底物为四种 NTP(ATP、GTP、CTP 和 UTP)；②确实氢供体尚未完全鉴定，但 FH₂ 可作为还原的氢供体；③5,6-二甲基苯并咪唑 钴胺辅酶（维生素 B₁₂ 辅酶）是一个必需成分；④Mg²⁺、ATP、dATP 刺激 CTP 还原和抑制 UTP 和 GTP 的还原；⑤用各种 dNTP 作为效应剂，以不同于大肠杆菌酶的模式进行刺激和抑制，但原理则相同。

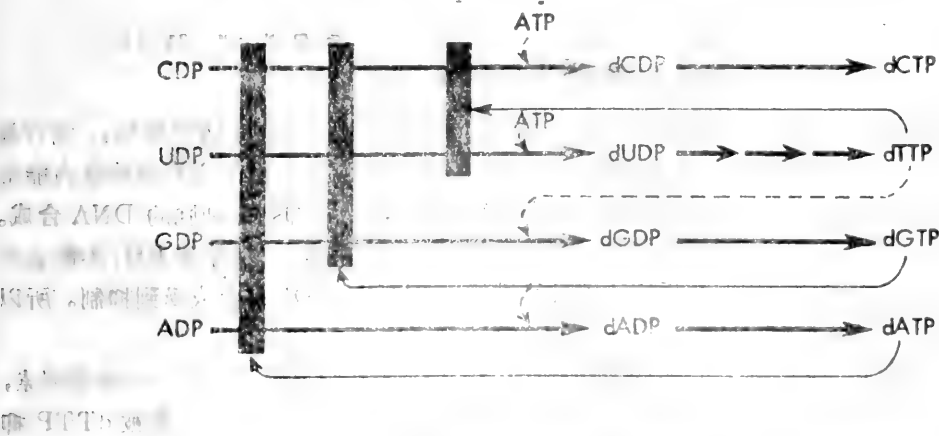


图12-2 通过 EColi 的核糖核苷二磷酸还原酶合成 dNTP 的别构调节
 ...→代表正效应 ↑代表负效应

(二)胸苷酸的生物合成

这一合成反应，主要是在胸苷酸合成酶催化下，使 dUMP 甲基化产生 dTMP。但反应

[illegible]

胸苷酸合成酶，在不生长的细胞中的活性很低，而在生长的细胞中活性增加。它可被 5'-UMP 抑制。一种抗癌药物 5-氟尿嘧啶之所以具有抗癌作用，是由于它在生物体内能形成 5'-F-UMP，从而再形成 5-F-dUMP，抑制胸苷酸合成，从而抑制癌细胞的 DNA 合成。

dCMP 在脱氨酶的催化下, 可转变为 dUMP, 因此 dCMP 脱氨酶可作为一个调节因素, 以保持生成足够浓度的 dTTP, 以用于合成 DNA。这个酶为 dCTP 所激活, 但被 dTTP 抑制。

八、核苷酸辅酶的生物合成

548

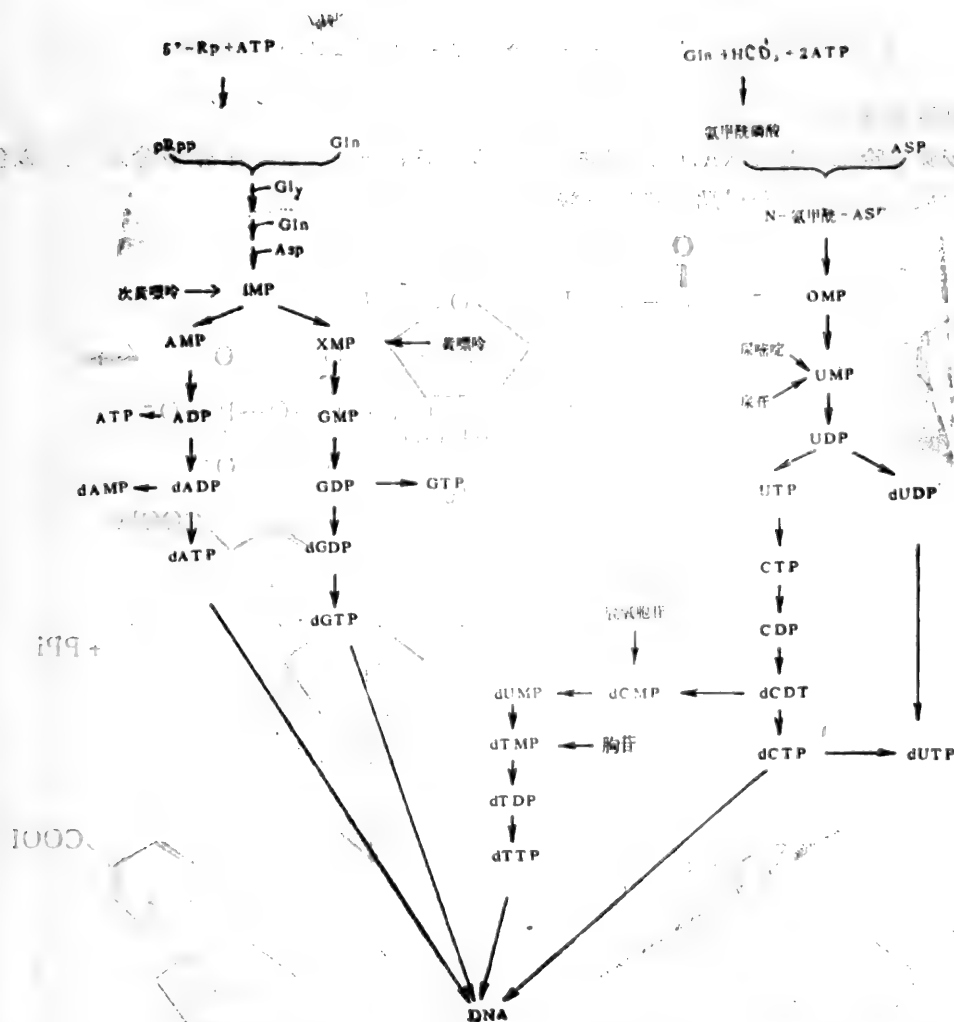
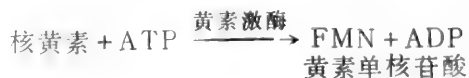


图12-4 各种 NMP、NDP、NTP、dNMP、dNDP、dNTP 的生物合成

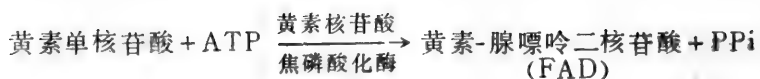
磷酸衍生物外，生物体还存在另一些核苷酸，如黄素核苷酸、烟酰胺核苷酸和泛酸核苷酸。它们都和上述核苷酸一样，在代谢上起着重要作用。其功能已在代谢各章节中作过介绍。这里仅介绍它们的生物合成反应及所需的酶系统。

(一) 黄素核苷酸

核黄素是哺乳动物主要的食物成分之一。它可以单核苷酸或二核苷酸的形式作为许多酶的辅基。黄素单核苷酸是由核黄素和 ATP 在黄素激酶的催化下合成的。结构见第五章。

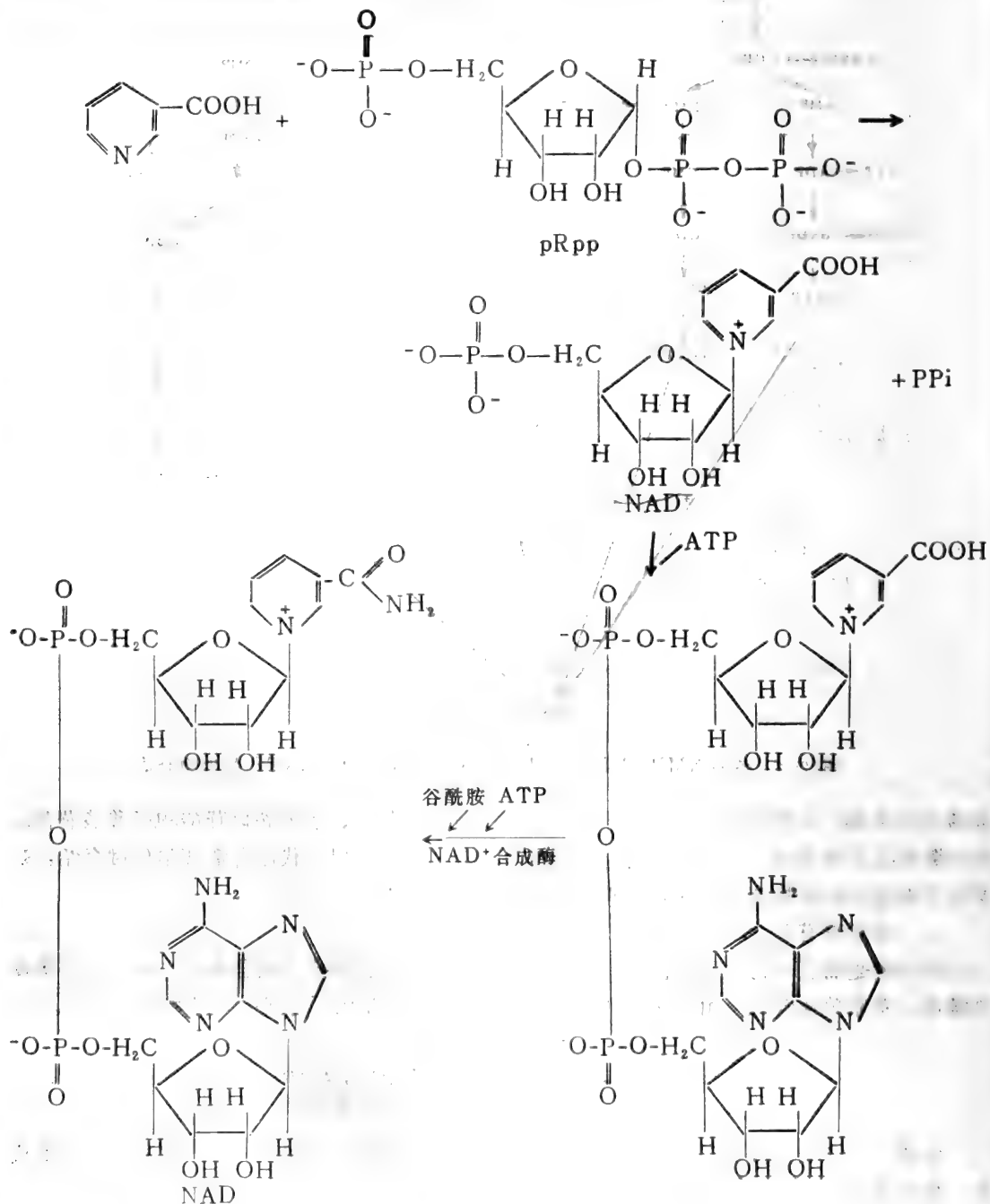


黄素二核苷酸是由黄素单核苷酸通过黄素核苷酸焦磷酸化酶催化的一个可逆反应而合成的。结构见第五章。



(二)吡啶核苷酸

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 NAD 含烟酰胺，它也是哺乳动物的重要食物成分之一。以色氨酸从头合成烟酸会直接获得烟酸单核苷酸。

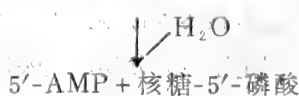
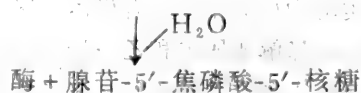


在哺乳类细胞中，烟酸与 pRpp 反应形成烟酸单核苷酸。旋即与 ATP 缩合形成脱酰胺—NAD。它继续与谷酰胺及 ATP 反应转变为 NAD⁺。这后一反应由 NAD⁺ 合成酶催化。

在红细胞（可能还有其它组织）中，NAD—焦磷酸化酶可催化烟酰胺与 pRpp 反应合烟酰胺单核苷酸(NMN)。这个酶也能继续催化 NMN 与 ATP 反应生成 NAD⁺ 和焦磷酸。

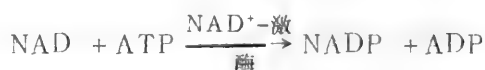


在植物和动物细胞中，没有找到任何能使烟酸直接转变为烟酰胺的酶。烟酸要转变成烟酰胺只有把烟酸经烟酸单核苷酸、脱酰胺—NAD⁺ 再转变为 NAD⁺。然后由烟酰胺腺嘌呤二核苷酸糖苷水解酶催化，使烟酰胺和核糖间的 N-糖苷键水解才能完成。这后一步反应如下式：



核苷酸焦磷酸酶能催化 NAD、NADP、FAD、ATP 和 硫氨酸焦磷酸酯 中的焦磷酸键水解，但其生理功能尚不清楚。

NADP 是 NAD⁺—激酶催化 NAD 磷酸化而成。



(三) 辅酶 A 的合成

辅酶 A (CoA) 由泛酸合成的过程已在第五章介绍。

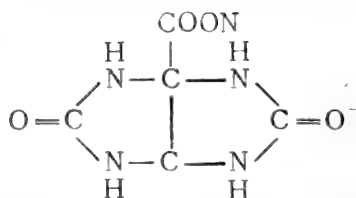
第二节 核苷酸的分解代谢

除了通过上述生物合成途径来提供核苷酸外，核苷酸也作为食物核酸的成分而存在。核酸与蛋白质不同，它不受胃中各种酶的作用，它的消化主要发生在十二指肠。胰核糖核酸酶只水解 RNA，释放嘧啶单核苷酸和以 3'-嘧啶核苷酸结尾的寡核苷酸。胰脱氧核糖核酸酶专一性地水解 DNA 成寡核苷酸。肠粘膜形成的磷酸二酯酶把一些寡核苷酸水解成单核苷酸。关于一些核酸酶和磷酸二酯酶的性质、专一性等已在第四章作过介绍。

一、嘌呤核苷酸的分解代谢

嘌呤核苷酸的分解已经经过多年的研究，腺嘌呤及其核苷和核苷酸在各种脱氨酶催化下水解脱氨而得次黄嘌呤及其核苷和核苷酸。鸟嘌呤及其核苷和核苷酸在各种脱氨酶催化下水解脱氨而得黄嘌呤及其核苷和核苷酸。次黄嘌呤、黄嘌呤随后在黄嘌呤氧化酶催化下氧化成尿酸。虽然各种生物中所含的各种酶分布远不相同，但嘌呤分解的流程似乎非常相似。

尿酸只为少数动物所分泌，大部分非排尿酸动物，体内已证明存在尿酸酶，能催化尿酸氧化成为可溶性更强的尿囊素。在其转变过程中似乎还经过许多中间产物，其中已知的有羧基乙炔-二尿基羧酸，其结构为：



鱼类、两栖类动物和更原始的有机体有尿囊素酶，可进一步催化尿囊素转变成尿囊酸，随即又通过尿囊酸酶降解成尿素和乙醛酸。鸟类则明显是排尿酸动物。

人和类人猿等的体内没有尿酸酶，故尿酸就是核苷酸分解的终产物，与微量黄嘌呤和次黄嘌呤等一起排出。进食无嘌呤食物时，人体尿酸的生成和分泌以恒速进行，这尿酸是内源嘌呤代谢产生的。通过测定尿酸的分泌，反映出嘌呤合成和降解近乎相等。有些食物如乳类、奶酪、卵类等嘌呤含量很低，而肝脏、胸腺等核酸含量丰富的食物则嘌呤量高。正常人血中尿酸浓度约为 7.5mg/dl，女人平均为 4.1mg/dl，男人平均为 5.0mg/dl，在体液中可溶性的尿酸一钠盐为 6.4mg/dl。如果血清尿酸盐水平超过此值，即存在高尿酸症。高尿酸症常是急性关节炎（又名痛风）的表征，痛风患者关节滑液的白细胞中常能观察到尿酸一钠盐结晶。慢性痛风患者有大量尿酸一钠盐以筋瘤形式沉积于软骨、软组织、腱和关节滑液的膜中。当尿酸钠沉积于肾脏的间隙组织中时，则会引起肾损伤。尿酸结晶也能在肾小管、肾骨盆或输尿管中形成，从而导致尿结石而阻碍排尿。

用别嘌呤醇处理，可缓解高尿酸症。别嘌呤醇可被黄嘌呤氧化酶氧化成别黄嘌呤，它是



黄嘌呤氧化酶的专一性抑制剂，能逐渐降低血和尿中的尿酸水平，此外，用此药处理的患者会降低总嘌呤核苷酸的合成。抑制嘌呤核苷酸生物合成的原因可能是由于增加了次黄嘌呤的

重新利用，用来合成核苷酸，且造成 pRpp 的下降。由于 嘌呤核苷酸的增加和 pRpp 的降低，最后导致酰胺磷酸核糖转移酶活性降低。

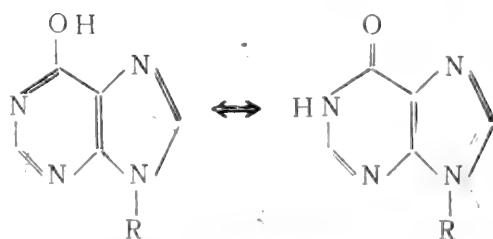
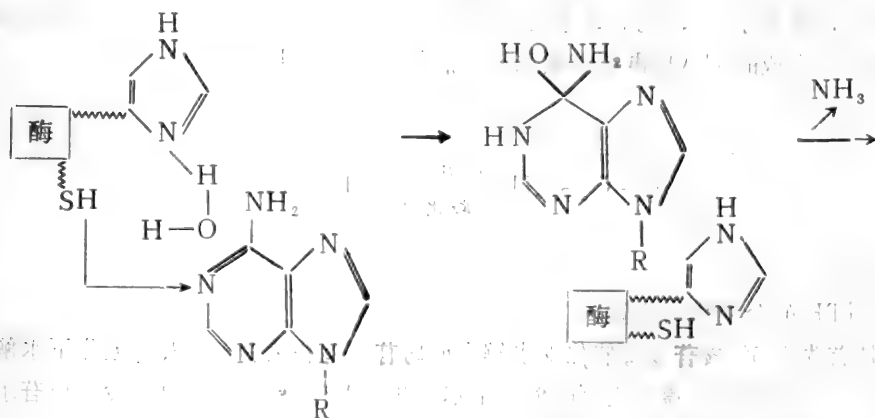
下面分别介绍各嘌呤核苷酸的分解代谢反应。

(一) AMP 的分解代谢步骤

①在非专一性 5'-核苷酸酶催化下，5'-AMP 水解成腺苷。

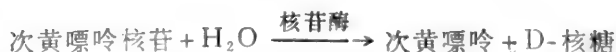


②腺苷在腺苷脱氨酶催化下水解脱氨形成次黄嘌呤核苷。该酶活性部位有一咪唑基和一SH 参与催化反应。反应机制如下式。

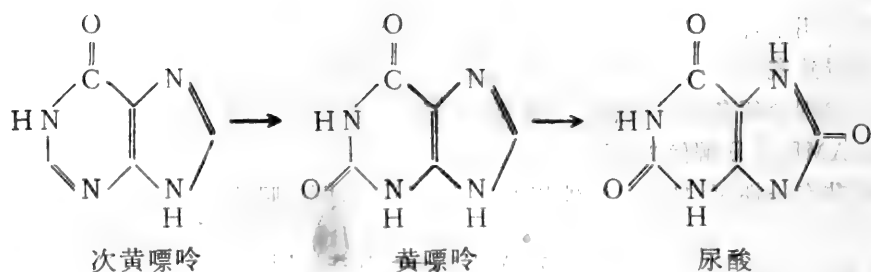


次黄嘌呤核苷

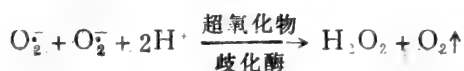
③次黄嘌呤核一旦形成，随即在核苷酶催化下形成次黄嘌呤和核糖。



④次黄嘌呤氧化首先生成黄嘌呤，再继续氧化生成尿酸，这个氧化反应是在黄嘌呤氧化酶催化下进行的。鼠肝黄嘌呤氧化酶分子量为 300,000 道尔顿，由两个相同亚基构成，每个亚基结合一个 FAD 和一个 Mo^{6+} 离子，并且含有四个非血红素铁-硫组分，这些组分构成一个电子传递体系，从底物到最终电子受体 O_2 分子运输电子，使次黄嘌呤最后氧化成尿酸是次黄嘌呤的 C-2 或黄嘌呤的 C-8 各除去一个 H^+ 和两个电子成为正碳离子，然后 H_2O

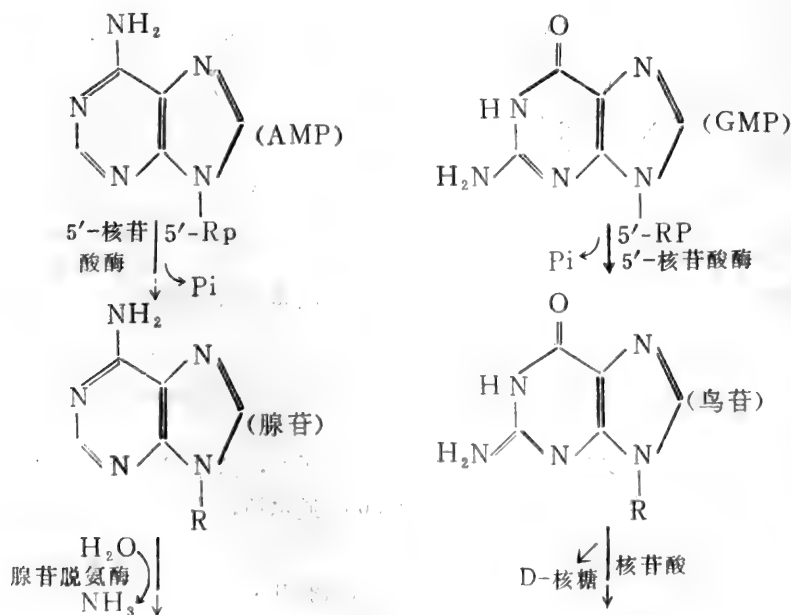


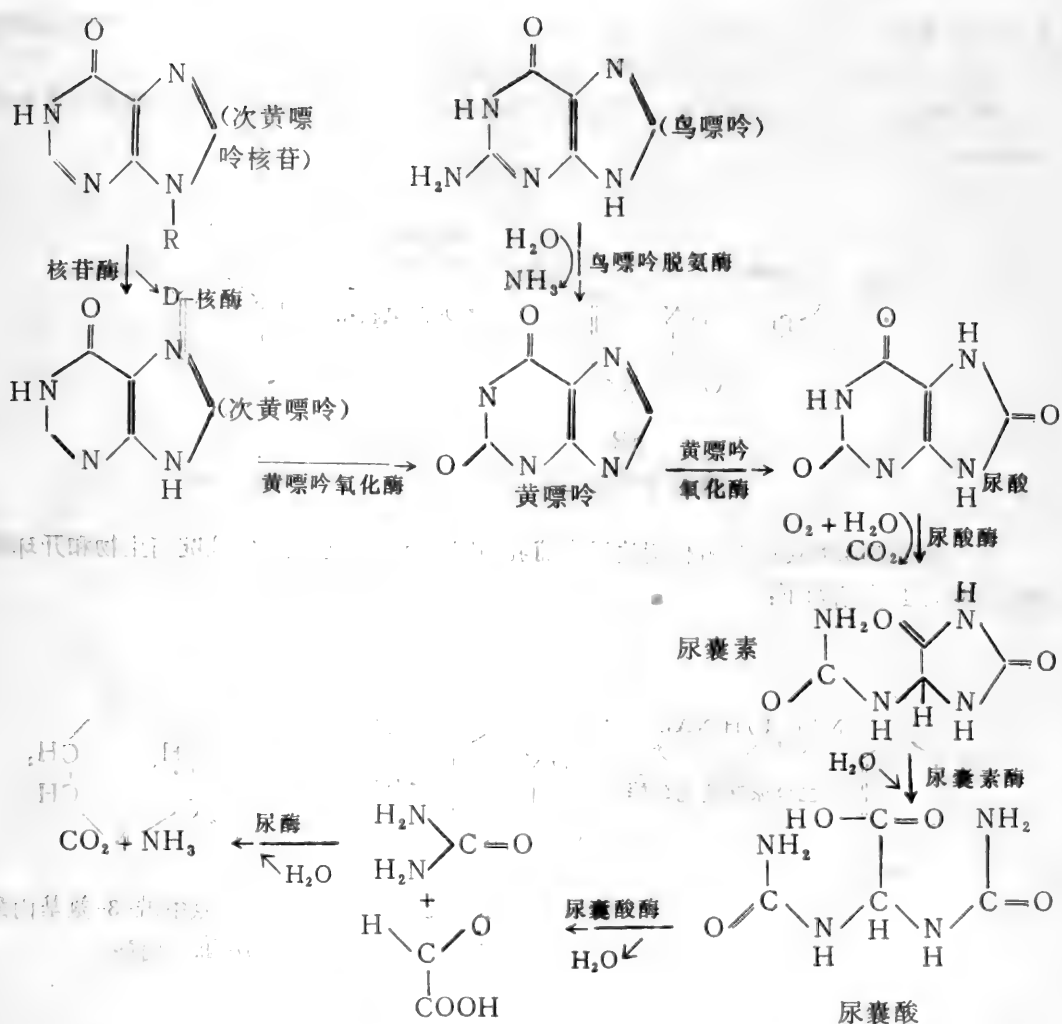
的 OH^- 攻击它们并取代失去的氢原子。酶中的 Mo^{6+} 首先作为电子受体，接受次黄嘌呤或黄嘌呤 C-2 或 C-8 传来的电子，然后又把电子传给 FAD，最后传给 O_2 分子， O_2 分子接受电子后形成超氧离子 O_2^- ，超氧离子很活泼，与 H^+ 反应而生成 H_2O_2 。该反应由超氧化物歧化酶催化，生成的 H_2O_2 再在过氧化氢酶催化下分解成 H_2O 和 O_2 。



(二)GTP 的分解代谢步骤

GTP 首先在 5'-核苷酸酶催化下水解生成鸟苷，鸟苷然后在核苷酶催化下水解成鸟嘌呤和 D-核糖。鸟嘌呤在鸟嘌呤脱氨酶催化下水解生成黄嘌呤。这与腺嘌呤在核苷水平上脱氨不同。现将两种嘌呤核苷酸的分解代谢过程对比如下式。





二、嘧啶核苷酸的分解代谢

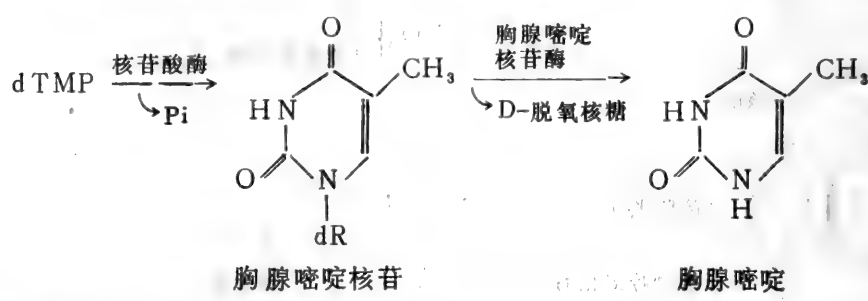
嘧啶核苷酸的分解代谢与嘌呤核苷酸一样包括脱磷酸、脱氨和糖苷键断裂等步骤。许多用于嘌呤衍生物的酶常可作用于相应的嘧啶化合物。

胞嘧啶核苷酸在胞嘧啶核苷酸酶催化下产生胞嘧啶核苷，再经胞嘧啶核苷脱氨酶催化脱

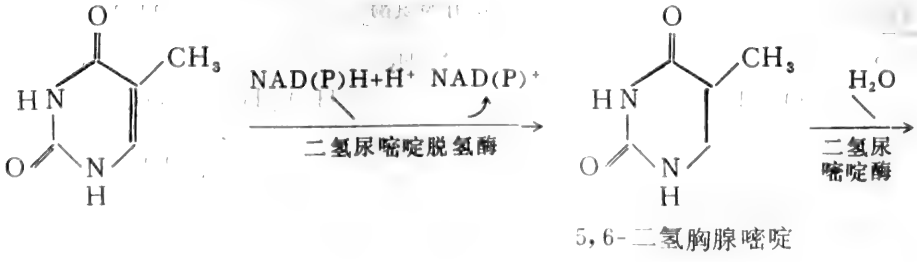
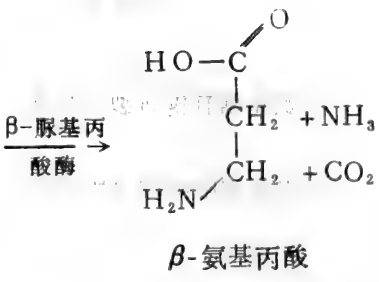
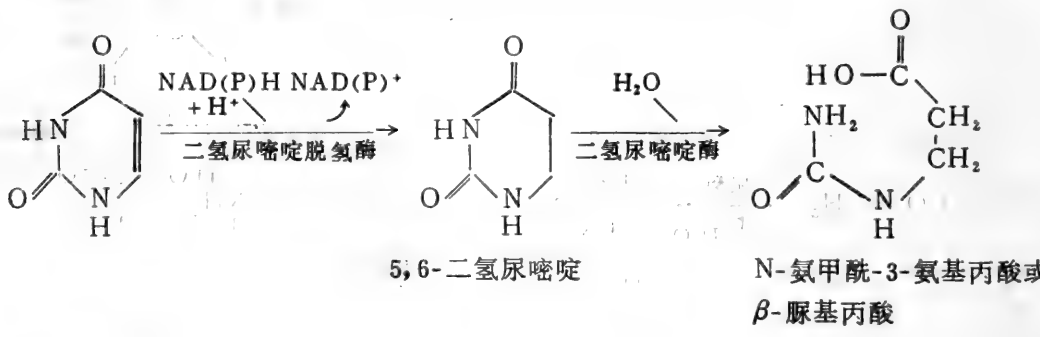


氨产生胞嘧啶核苷。这个酶广泛分布于动物组织和微生物中。胞嘧啶也可在胞嘧啶脱氨酶催化下脱氨生成尿嘧啶，这已在酵母和其它微生物中观察到。

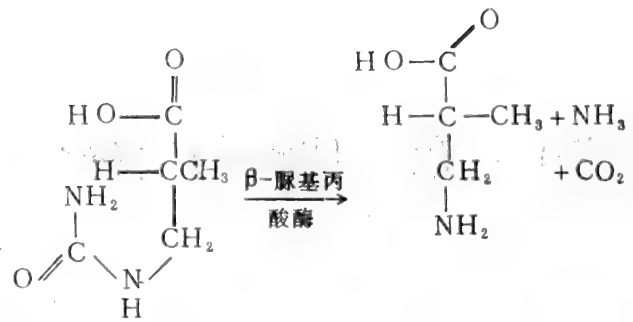
胸嘧啶核苷酸在核苷酸酶催化下去磷酸生成胸苷，再在胸腺嘧啶核苷酶催化下水解生成胸腺嘧啶。



尿嘧啶和胸腺嘧啶的分解代谢途径在哺乳动物中包括还原成二氢嘧啶衍生物和开环等一系列反应。兹介绍如下：

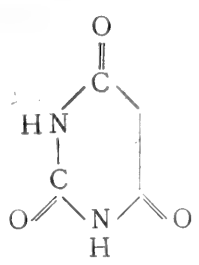


氨基酸的分解
 氨基酸的分解
 氨基酸的分解
 氨基酸的分解
 氨基酸的分解
 氨基酸的分解

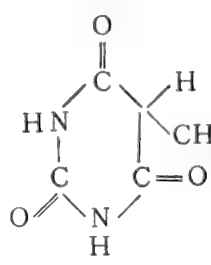


N-氨甲酰-3-氨基异丁酸式β-脲基异丁酸
 β-氨基异丁酸

在有些细菌中，尿嘧啶和胸腺嘧啶进行氧化降解是通过巴比妥酸和甲基巴比妥酸而生成尿素和丙二酸或甲基丙二酸。



巴比妥酸



甲基巴比妥酸

第十三章 核酸的生物合成

生物的遗传信息编码于 DNA 的核苷酸序列中，通过 DNA 的复制，亲代的遗传信息即传到子代。DNA 的遗传信息是通过信息 RNA(mRNA)的传递而获得表达的。即 DNA 的遗传信息转移到 mRNA 中，以 mRNA 的核苷酸序列表示出来，这一过程称为遗传信息的转录。现代所称的遗传密码实际上就是 mRNA 上的核苷酸序列，它可翻译成相应蛋白质的氨基酸序列（将在十四章介绍）。mRNA 转录 DNA 信息的过程，及除 mRNA 外其它各种 RNA 的形成，这些都是现代分子生物学研究的重要内容。也是本章所要介绍的主要内容。

第一节 DNA 的复制

近年来，已在不同水平上对 DNA 的复制进行过研究。如完整原核和真核细胞水平上的研究；纯酶水平上的研究；利用可渗透的微生物、细胞溶物、游离细胞核等方面的研究，并且都已从各方面得出了有重要价值的结果。

一、半保留复制

从 DNA 的双螺旋结构可以设想：双螺旋可解开成两条单链，以单链为模板按 A—T，G≡C 氢键配对原则，使对应于模板的四种脱氢核苷酸逐个进入相应位置，分别合成对应于这两条单链的新链。这样就会成为具有一新一旧与母 DNA 相同的两条双螺旋子 DNA。如图13—1和13—2。

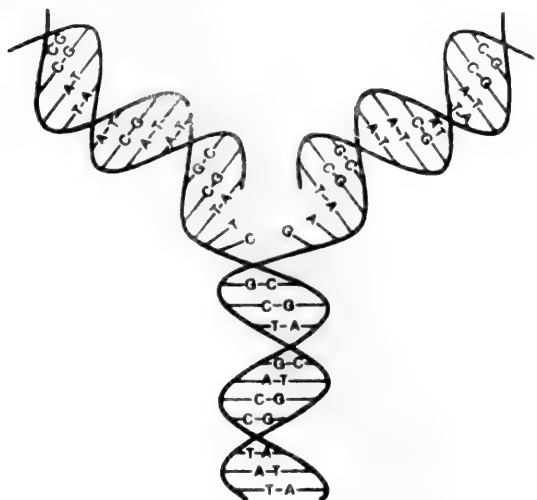


图13—1 DNA 半保留复制图

这种设想的复制形式，称为半保留复制。1958年 Meselson—stahl 做了一个巧妙的实验，首次为半保留复制提供了可靠的证据。实验步骤及结果如下：

用含96.5% 同位素的 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 培养基培养大肠杆菌，连续培养 14代，让其 DNA 用 ^{15}N 深入标记。

将含 ^{15}N DNA 的细胞转移到 $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ 培养基中继续培养，并不时取菌样进行分析。

将所取各菌样，用硫酸十二酯钠(DS)溶菌，并抽提 DNA，在 CsCl 密度

梯度中以 $140,000 \times g$ 离心20小时,使 DNA 达沉降平衡,然后观察 DNA 在 CsCl 中的分布。结果发现: 初始菌样中的 DNA 在超离心时出现一个单带, 相当于 ^{15}N 标记的 DNA (图13—2中的 O 代)。在 $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ 中培养一代后的菌样,其 DNA 在超离心时仍为一个单带, 但比前者轻, 相当于含一半 ^{15}N 和一半 ^{14}N 的 DNA (图13—2中 F_1)。培养两代后的菌样,其DNA 在超离心时出现两条带, 一条与图13—2中 F_1 相同, 相当于 ^{14}N , ^{15}N —DNA, 而另一条则更轻, 相当于 ^{14}N , ^{14}N —DNA (同图13—2的对照轻 DNA)。以后各代菌样的 DNA 均为两个带, 但轻 DNA 量逐渐增加 (图13—2 中的 F_2 , F_3)。

然后, 把含 ^{14}N , ^{15}N 的杂合 DNA 加热使双链解链, 就形成 ^{14}N 和 ^{15}N 两个轻重不同的单链。

Meselson—Stahl 实验充分说明: 大肠杆菌的 DNA 合成是采取半保留复制方式。而

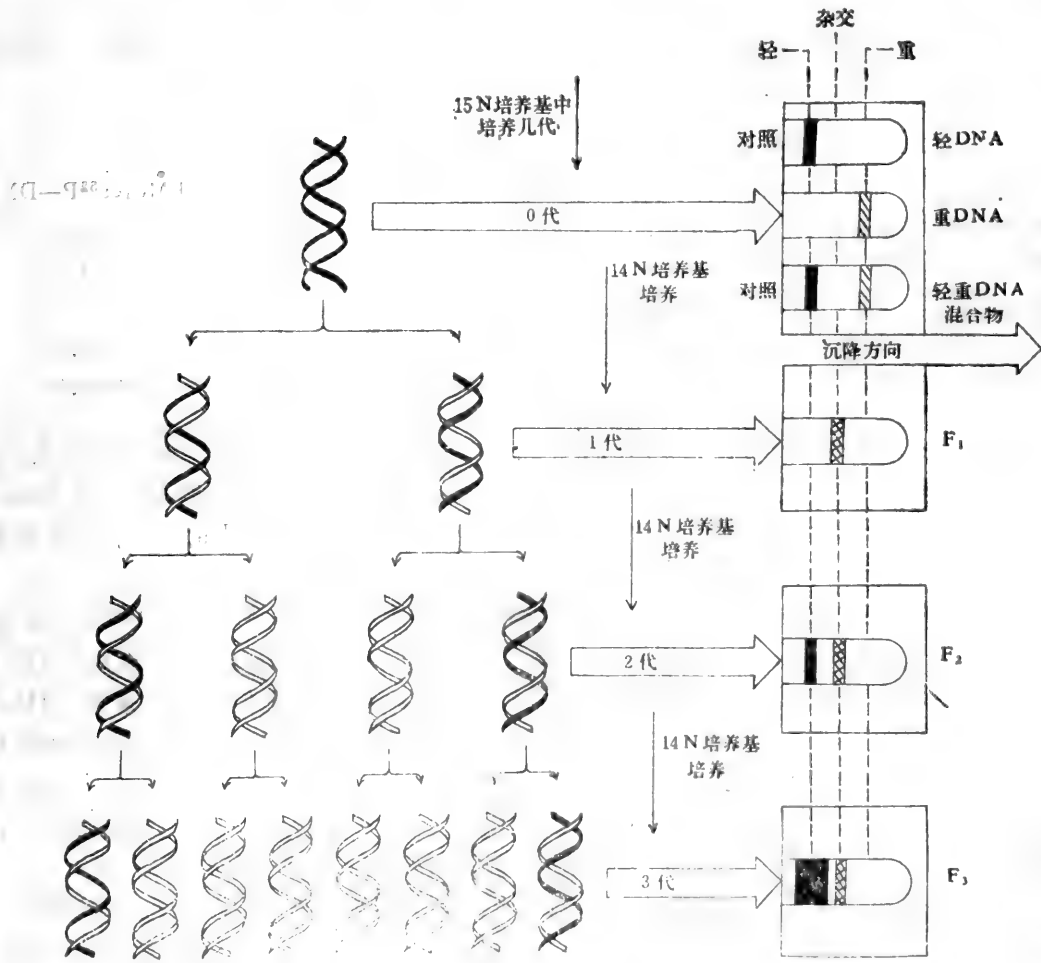


图13—2 Meselson—Stahl 实验所示 E. coli 染色体 DNA 的半保留复制的实验结果 (右图) 和解释 (左图)

且不管复制多少次，分开的每个 DNA 单链都保持完整而没有遭到任何破坏。

后来有人在大肠杆菌染色体复制时，参入氚标记的 DNA，新合成的 DNA 通过放射自显影，证明其含氚量相当于染色体中只有一个新合成的 DNA 单链。此外，在植物 DNA 合成期间将氚标记胸苷参入作为原料，在细胞分裂期间发现两个子染色体单体都带氚标记。而当除去了³H—胸苷后，下一轮复制出来的染色体，每个都带一个含³H 和一个不含³H 的染色体单体。这两个实验进一步在染色体水平上证实了对 DNA 半保留复制的预测。

二、DNA 的复制机制

(一) DNA 合成条件的研究

1956年 Kornberg 从大肠杆菌无细胞提取物中分离得一个激酶系统，它能使胸苷转变为 dTTP。后来他们又用标记的 dTTP 作底物，发现有一种酶能使 dTTP 参入到 DNA 中。他还将该酶纯化到均一程度，进行了一系列体外试验。

1967 Kornberg 用纯化的酶，设计了一个实验以进行 DNA 合成条件的研究。他们用 ³²P—dCTP 观察不同条件下 ³²P—dCTP 参入 DNA 中的量，结果如表13—1。

表13—1 ³²P—dCTP 参入 DNA 中的实验结果

反应条件	PMoles ³² P—DNA
³² P—dCTP + 酶系统	0.0
³² P—dCTP + DNA 模板 + 酶系统	2.5
³² P—dCTP + dGTP + DNA 模板 + 酶系统	5.1
³² P—dCTP + dGTP + dTTP + DNA 模板 + 酶系统	15.7
³² P—dCTP + dGTP + dTTP + dATP + DNA 模板 + 酶系统	3300.0

表13—1反应条件中的 ³²P—dCTP 以及其它 dNTP 都为 5nmole (³²P—dCTP 为 7.2 × 10⁷c. p. m/mole) 溶于 0.3ml 中。反应混合物中含 MgCl₂ 1.9μmole，模板 DNA 为 10μg，纯酶为大肠杆菌 DNA 聚合酶 3μg，缓冲液为 20μmole 甘氨酸缓冲液(pH9.2)。在 37℃ 保温半小时。

表13—1的结果充分说明 DNA 的合成(复制)需要模板 DNA、Mg⁺⁺、四种 dNTP 和 DNA 聚合酶。Kornberg 等不仅弄清了 DNA 合成需要的条件，而且还发现所合成的 DNA 产物与天物 DNA 一样都是由 A≡T 和 G≡C 配对而成。此后，他们用不同来源的 DNA 作模板，发现不管 DNA 净合成的量如何，合成产物的碱基比与模板 DNA 一致。如用人工合成的(dA—dT)聚合物为模板，则只有 dAMP 和 dTMP 可参入产物 DNA 中。这充分说明 DNA 的合成完全是按模板指令，使 dNTP 中的 dNMP 逐个参入，而与底物 dNTP 的各成分之比无关。即 DNA 的合成完全是采取复制形式

进一步研究又发现 DNA 的合成除需上述条件外，还必需具备一个带 3'—OH 的寡核苷酸引物。这个引物以碱基配对形式与模板结合，从而引导一个个核苷酸底物进入以合成 DNA。但不能以双链 DNA 作为引物模板，除非双链有一个缺口，则暴露的 3'—OH 可作为引物，使 dNMP 逐个结合上去，使缺口填满。但 DNA 决不能在无引物条件下合成。

(二) DNA 合成的反应机制

DNA 是怎样按模板复制的？各种 dNTP 是怎样相互反应而形成 DNA 链的？Kornberg 等采用“最邻近频率”分析技术获得了满意结果。其方法是首先用纯酶、特异模板 DNA、引物、四种 dNTP（其中一种带 ^{32}P 标记，如 $5'\text{dA}^{32}\text{PPP}$ ）一起温育，让其合成 DNA。然后分离新合成的 DNA，并用小球菌脱氧核糖核酸酶或脾磷酸二酯酶使之水解成一个个 $3'\text{-dNMP}$ 。结果发现 ^{32}P 从原来 dATP 的 $5'$ -位转移到了与进入 dAMP 最邻近的核苷酸的 $3'$ -位上。也就是说在 DNA 合成时，dATP 上 ^{32}P 标记的 $\alpha\text{-P}$ 成为一个磷桥，使进入的 dAMP 与多核苷酸引物生长端的一个核苷酸的 $3'\text{-OH}$ 相互作用。以上结果可用图 13—3 予以说明。式中 Z 为引物生长链末端与进入的 AMP 最邻近的一个核苷酸。原来在 $\text{dA}^{32}\text{P-PP}$ 上的 ^{32}P 标记的 $\alpha\text{-P}$ 原子在 DNA 合成时成为 Z—A 间的 ^{32}P 一桥，它水解后即转移到 Z-核苷酸的 $3'$ -位上去了。

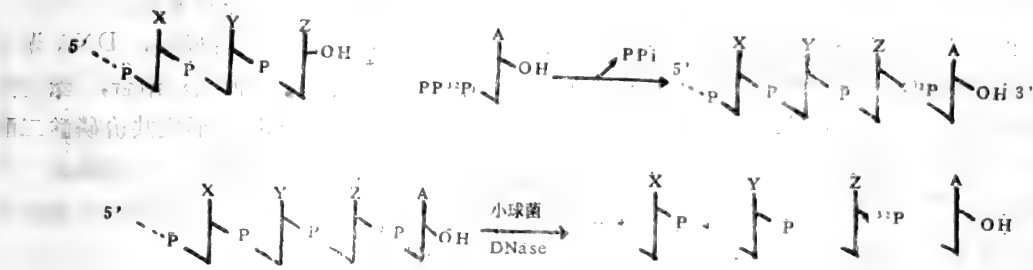


图13—3 DNA 合成机制的证实

从这样的实验就可了解到所合成的 DNA 中 A_pA 、 T_pA 、 G_pA 和 C_pA 等二核苷酸的频率。如果改用 $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ 标记的 dTTP、dGTP 和 dCTP 进行同样试验和分析，将可获得其它 12 种二核苷酸的频率。他们用 *Mycobacterium Phlei* DNA 作模板时所得结果见表 13—2。

表 13—2 *Mycobacterium Phlei* DNA 作模板时合成 DNA 的最邻近频率

^{32}P 标记dNTP	分离含 ^{32}P 的 $3'\text{-dNMP}$			
	A_p	T_p	G_p	C_p
dATP	A_pA	T_pA	G_pA	C_pA
	0.024	0.012	0.065	0.063
dTTP	A_pT	T_pT	G_pT	C_pT
	0.031	0.026	0.060	0.045
dGTP	A_pG	T_pG	G_pG	C_pG
	0.045	0.063	0.090	0.139
dCTP	A_pC	T_pC	G_pC	C_pC
	0.064	0.061	0.122	0.090
总和	0.162	0.164	0.337	0.337

从表13—2可说明以下几个问题：

1. 新合成 DNA 的腺苷酸总和等于胸苷酸总和（一、二纵行），鸟苷酸总和等于胞苷

酸总和(三、四纵行)。这和天然 DNA $A=T$ 、 $G=C$ 配对的特性一致。进一步说明了 DNA 的复制机制。

2. 各核苷酸合成 DNA 时不是随机结合的, 因为 T_pA 不等于 A_pT , G_pA 也不等于 A_pG , 而且偏差很大。后来以天然小牛胸腺 DNA 和酶促合成的小牛胸腺 DNA 作模板来合成 DNA, 分析新合成 DNA 的最邻近核苷酸频率时发现二者完全相等。而以其它来源的 DNA 作模板时, 所合成的新 DNA 的最邻近核苷酸频率则与小牛胸腺的很不相同。这进一步证实 DNA 的合成完全按模板 DNA 指令逐个加入 dNMP。

3. 从表中的邻近频率可以看出, 除 $A_pA = T_pT$ 、 $G_pG = C_pC$ 外, $T_pC = G_pA$, $T_pG = C_pA$, $C_pT = A_pG$, $G_pT = A_pC$ 。而 A_pT 与 T_pA 、 G_pA 与 C_pT 、 A_pG 与 T_pC 、 C_pG 与 G_pC 等则相差很大。这说明所合成的 DNA 链中, 其两股 DNA 链的碱基完全按 Watson Crick 模型反向配对。也就是说 DNA 合成时是按模板指令反向逐个参加核苷酸的。

根据以上一系列研究结果, DNA 合成机制可总结如下: 当 DNA 合成时, DNA 聚合酶结合于模板上, 在引物的 3'-OH 端进入的 dNTP, 以其碱基与模板配对结合, 聚合酶然后催化引物的 3'-OH, 对进入 dNTP 的 α -P 原子进行亲核攻击, 形成共价磷酸二酯键, 并释放一个焦磷酸。DNA 链延伸一个核苷酸单位, 酶沿 DNA 模板向 5'-端移动一个核苷酸距离, 到达新进入的核苷酸的 3'-OH 处。以后再重复上述过程, 直至 DNA 链延伸到模板末端。如图 13-4。

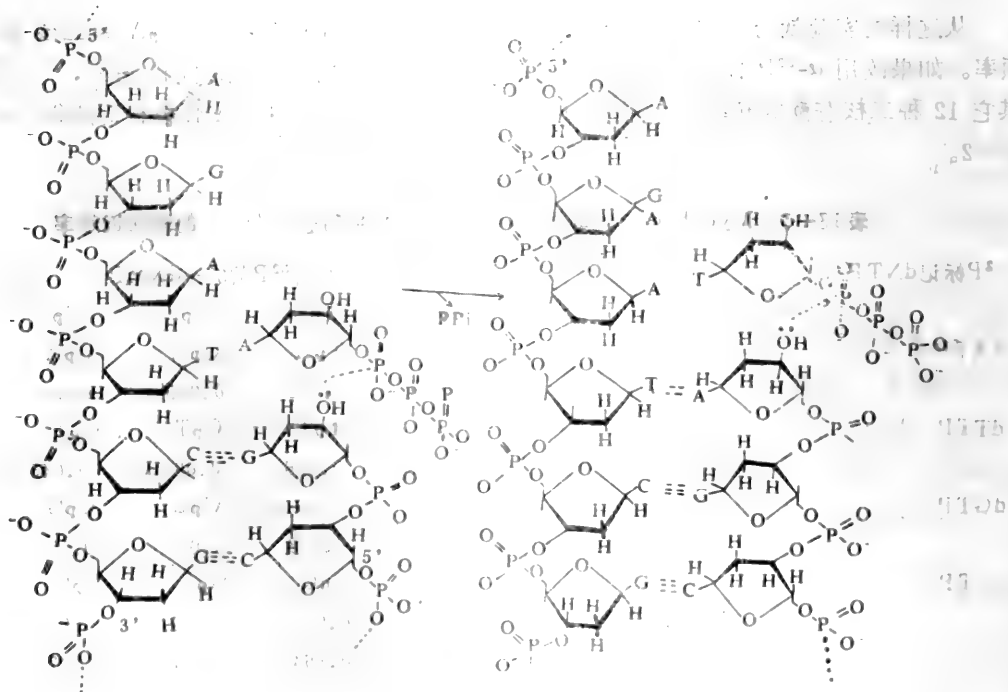


图 13-4 DNA 合成过程中 DNA 链的延伸反应

三、与 DNA 合成有关的酶类

在 DNA 复制过程中,需要各种蛋白质和酶参加反应,它们各执行其专一性功能。其主要者而功能又较清楚的几类分述于下。

(一) DNA 聚合酶

DNA 聚合酶已从不同来源的生物体中获得,并进行了纯化。所有这类酶催化的基本反应都是以 DNA 为模板,以寡聚核苷酸为引物,以 dNTP 为底物,催化 dNTP 相互缩合的反应。DNA 的合成从引物 3'-OH 端开始,合成的链从 5'→3' 方向延伸,每参入一个 dNTP,释放一个焦磷酸。

根据目前的资料,大肠杆菌中 DNA 指导下的 DNA 聚合酶有 I、II、III 三种。其它细菌如枯草杆菌等也有类似的 DNA 聚合酶。

1. 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I (Pol I)

Kornberg 在研究 DNA 复制条件时所用的酶即属于此,故又名 Kornberg 酶。

(1) Pol I 的性质

纯酶的 MW = 109,000 道尔顿,为一单肽链。N 端为甲硫氨酸,含-SH 侧链,每个分子含有一个 Z^{++} ,分子为球形,其直径为 6.5nm。在电镜下,可以观察到它形成二聚体。每个细胞约含 400 个酶分子。

(2) Pol I 的功能

用枯草杆菌蛋白酶处理可将 Pol I 切成两个片段。大片段为 MW = 76,000 道尔顿,具有聚合酶活性和 3'→5' 外切核酸酶活性;小片段的 MW = 36,000 道尔顿,在有 DNA 存在时显 5'→3' 外切核酸酶活性(这片段相当于分子的 N-端)。因此,整个酶分子具有三种活性,所以它也可看作是一个多功能酶,三种功能同时存在于一个单肽链上。

Pol I 的聚合酶活性已如上述,其聚合速度约为 1000 个核苷酸/每分钟。该酶亦能催化 DNA 的磷酸化反应(相当于聚合反应的逆反应)。但由于聚合反应生成的焦磷酸可迅速通过无机焦磷酸酶水解,故逆反应的生理意义不大。

Pol I 的 3'→5' 外切核酸酶活性是从 3'-OH 端水解 DNA 单链得 5'dNMP。在认识 Pol I 的整体功能之前,人们曾把 Pol I 的这个活性称为外切核酸酶 I。Pol I 的这个功能,似乎是识别并切去正在延伸中的、引入末端的错配对的核苷酸,以校对正在聚合过程中所造成的错误,增强 DNA 复制的真实性。其机制可示如图 13-5。

有人认为 Pol I 的 3'→5' 外切核酸酶活性可能只在错配对的修补中起作用,而聚合过程中可能存在其他校对机制。

DNA Pol I 的 5'→3' 外切核酸酶活性,是切割双链 DNA 的一个区段,从 5'-端连续释放核苷酸。当大肠杆菌 DNA Pol I 结合于双链 DNA 上一个缺口时,往往两种活性同时起作用。聚合活性使 3'-OH 端延伸,而 5'→3' 外切核酸酶活性则水解 5'-端核苷酸成为 dNMP,以造成 DNA 单链上的缺口移动,如图 13-6。这一缺口的位移过程,在酶达 DNA 分子末端时才终止。DNA Pol I 的 5'→3' 外切核酸酶活性可用于切去错配对的核苷酸,也可消除紫外线对 DNA 作用后所产生的胸腺嘧啶核苷酸二聚体, DNA 合成时亦常利用这

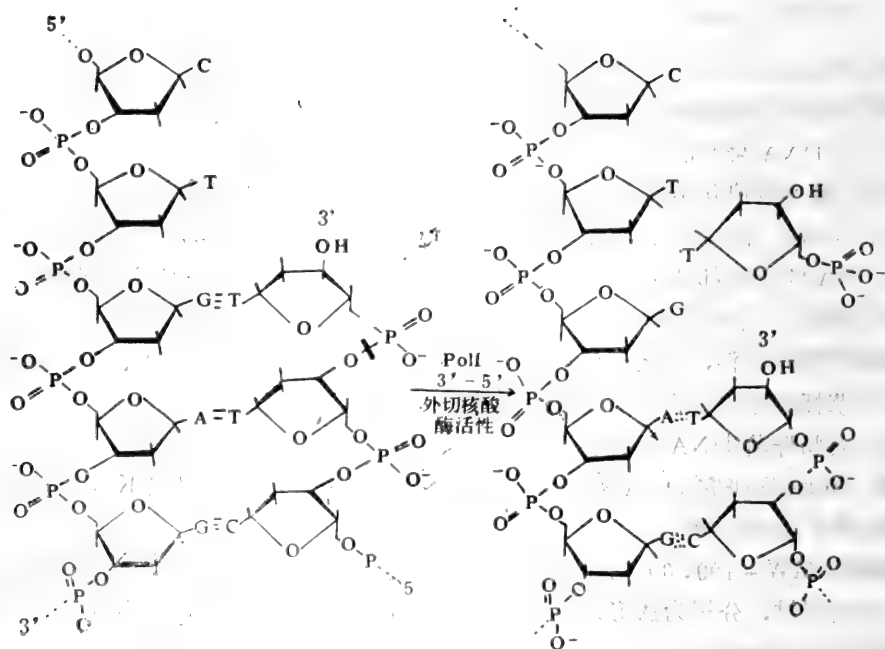


图13-5 DNA 聚合酶外切核酸酶反应

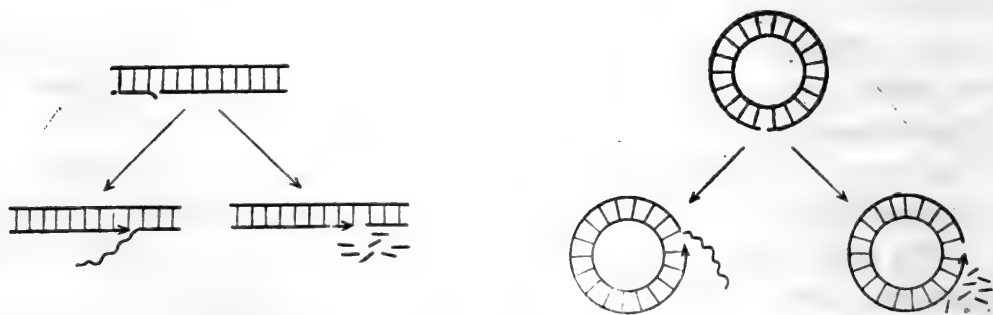


图13-6 DNA Pol I 的两种活性（聚合活性和5'→3'外切活性）
同时作用，使 DNA 上的单链缺口移位

一手段以除去产生的 RNA 引物。DNA Pol I 的5'→3'外切活性示如图13-7。

目前已分离了好几种缺 DNA Pol I 的突变体，如大肠杆菌突变体—Pol A⁻突变体，其 Pol I 的活性只有野生型的1%或更少，但菌体仍能正常增殖，只是对紫外线、电离辐射和烷化剂等很敏感。这意味着菌体缺乏 DNA Pol I，对除去 DNA 损伤，切除错误配对

核苷酸，填补缺口，修复 DNA 等作用有明显缺陷。并且 DNA Pol I 合成 DNA 的速度也非常慢。由此可见，DNA Pol I 不是 DNA 合成的主要复制酶。它的功能只是在以 RNA 作引物时，切去 RNA 引物，并填补 DNA 上由于各种原因所形成的缺口等。而 DNA 的复制，则另有其它聚合酶来完成。

W·M·M

不道 200,000

补的 3'→5'

← 2'→3' 5'

出口端: 3'→5'

不 5'→3' 10'

不 5'→3' 10'

不 5'→3' 10'

不 5'→3' 10'

不 5'→3' 10'

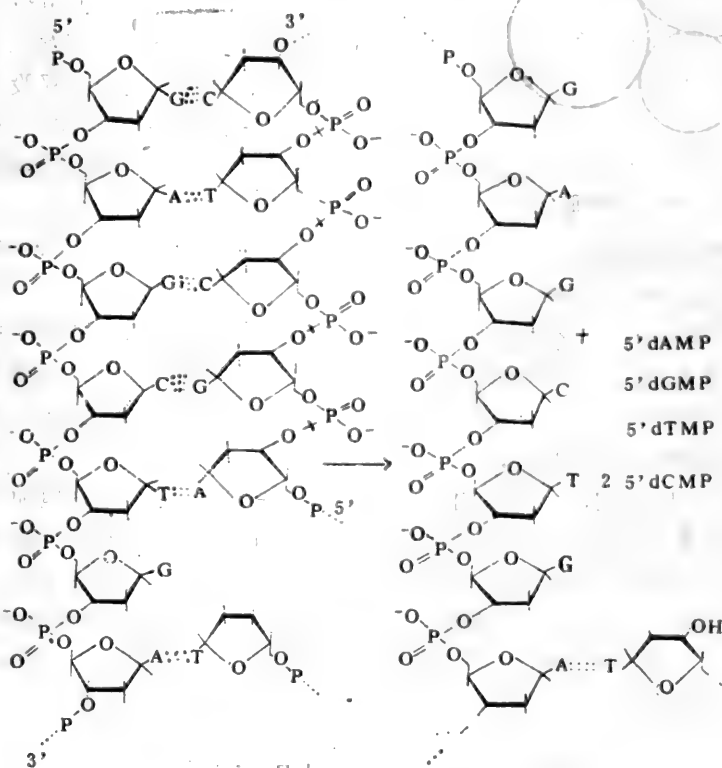


图13-7 DNA 聚合酶的5'→3'外切核酸酶活性反应

2. 大肠杆菌聚合酶 II (Pol II)

由于大肠杆菌的 Pol A⁻ 突变株在不含 DNA Pol I 时仍能正常增殖，并正常复制 DNA，这促使人们继续找寻其它 DNA 合成酶类。后来在 DNA Pol A⁻ 的无细胞提取物中，找到了两种聚合酶，称为 DNA 聚合酶 II 和 DNA 聚合酶 III (Pol II 和 Pol III)。由于在野生型大肠杆菌中它们的含量很少，故以前没有检测出来。Pol II 在 DNA 合成上所需条件及基本功能，都与 Pol I 相似，但它缺乏 5'→3' 外切核酸酶活性。Pol I 最适宜于催化带长链的双链 DNA，甚至只带一小段引物的单链 DNA 的复制。而 Pol II 则适宜于催化以带小缺口 (50—200bp) 的双链 DNA 为模板的反应。缺口太大则催化活性降低。

Pol II 分子量为 120,000 道尔顿，每个大肠杆菌细胞只有 100 个酶分子，其活性很低。在大肠杆菌 Pol B₁ 突变体中，其活性只有正常细胞的 0.1%，但菌体仍能正常增殖，只是对紫外线和诱变剂等很敏感。推测 Pol II 的功能也主要是起 DNA 的修补作用。

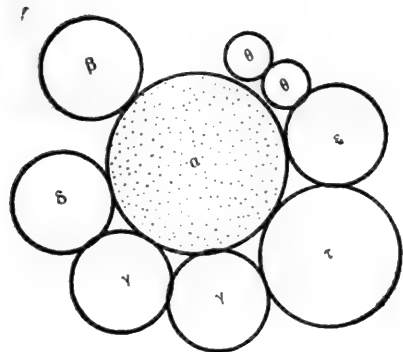


图13-8 DNA聚合酶Ⅲ全酶

3. 大肠杆菌聚合酶Ⅲ(Pol Ⅲ)

此酶1972年才发现, 现已纯化到20,000倍。它在细胞中以复合状态存在。全酶中的 α -亚基(由dnaE或Pol c基因编码)的MW=140,000道尔顿。还有两个小亚基 ϵ -亚基(M·W=25,000道尔顿)和 θ -亚基(M·W=10,000道尔顿), 前者具有3'→5'外切核酸酶活性。在体外, Pol Ⅲ对带单链尾巴的双股DNA, 有5'→3'外切核酸酶活性。因此该酶不能利用大缺口的引物/模板合成DNA, 而只能利用小缺口的引物/模板合成DNA。

在大肠杆菌中, Pol Ⅲ含量很少, 每个细胞只有10个酶分子, 但其活性很高, 约为Pol I的15倍, Pol Ⅱ的300倍。

从一些诱变剂处理的大肠杆菌中分离得一种温度敏感突变体, 其中的Pol Ⅲ在42℃不能复制DNA, 该菌在此温度下停止生长。说明DNA Pol Ⅲ是菌体内催化DNA复制的主要聚合酶, 它的含量虽低, 但对dNTP底物的 K_m 很小, 所以催化聚合的速度很高, 因而能胜任催化体内DNA的复制任务。

即使提供一个引物DNA, Pol Ⅲ仍不能利用单链DNA作模板, 但加入一些其它蛋白质(称为辅聚合酶Ⅲ)或其它因子则成为更复杂的Pol Ⅲ'。在ATP及类脂等存在下, 它能使以氢键结合于环状单链M₁₃、G₄或 $\phi \times 174$ 等DNA上的RNA引物延伸。当DNA链延伸到另一RNA引物的5'-端时, 延伸反应停止。这时Pol I以5'→3'外切核酸酶活性切去RNA引物, 并修补留下的空隙, 使整个DNA链合成完成。近年来关于Pol Ⅲ的全酶组成可参见表13-3和图13-8。

表13-3 大肠杆菌 Pol Ⅲ全酶组成

亚基	M·W	编码基因	名称	
α	140,000	dnaE 或 Pol C	Pol Ⅲ 核心酶	聚合酶Ⅲ*
ϵ	25,000			
θ	10,000			
τ	83,000			
γ	52,000	dnaI	EF Ⅱ	辅聚合酶Ⅲ*
δ	32,000	dnaX	EF Ⅲ	
β	44,000	dnaN	EF I	
				全酶

4. 真核细胞中的DNA聚合酶

真核细胞中的DNA聚合酶已得到分离, 并进行过研究。它们的作用条件和功能类似于细菌的DNA聚合酶。

最早从细胞浆中获得的可溶性DNA聚合酶称为DNA聚合酶 α (DNA Pol α), 它的活性随细胞生长速度的增减而增减。在细胞分裂的S期达高峰。纯化到200倍的小牛胸腺DNA Pol α 于1965即已获得。它是一个复合体, 蔗糖密度梯度离心得一个6.8S的宽峰; 在凝胶过滤时其活性在几个区出现, M·W=220,000道尔顿称为A-型。用尿素处理, 该酶释放一个碱性组分(C-型, M·W=156,000道尔顿)。经一蛋白酶水解得M·W=140,000

和103,000道尔顿的 D-型和 B-型。所有这些酶型 都有活性。C-型 DNA Pol α 是与 四种蛋白结合在一起的, 它只是一个核心酶。它们的分子量及结合关系如下:

M.W		} 形成一个活泼的不 均一的寡聚体
156,000	核心酶	
64,000	} 结合蛋白	
61,000		
58,000		
54,000		

DNA Pol α 的最适 pH 为6.5—8.0。从生长细胞中的高酶活性, 可以证明该酶在真核细胞 DNA 复制中起主要作用。

DNA Pol α 对一个有缺口的 DNA 模板显最适活性。用单链 DNA 为模板, 由于形成过渡的发夹结构, 故显示惊人的合成能力。用寡聚核糖核酸或脱氧核糖核酸作 引物可催化单链 DNA 的复制, 但不能结合到双股 DNA 上。真核 Pol α 没有外切核酸酶活性, DNA 合成中的校对作用, 可能是通过一种动力学的校对。有人认为, 酶在结合正确核苷酸后, 可采取一种构象形式而起催化作用。

在真核细胞核中获得的另一种 DNA 聚合酶称 Pol β , 其活性与细胞生长速度无关。该酶为一单肽链, 最适 pH 为8.6~9.0, M·W = 43,000道尔顿。天然 DNA 用 DNase 处理后产生的缺口有3'-OH, 可用 DNA Pol β 催化修补。在寡聚脱氧核苷酸引物存在下, 它可催化合成一核糖核酸模板。但它对变性 DNA 模板, 或寡聚 RNA 引物不起催化作用。它的功能可能是修补 DNA。

动物细胞中也有少量 M·W = 119,000道尔顿的 DNA 聚合酶 γ (DNA Pol γ), 这与线粒体中的 DNA 聚合酶相同。它以寡聚 DNA 为引物, RNA 为模板可催化 DNA 的合成。

此外, 近年来也发现叶绿体中有合成它自身 DNA 的聚合酶。

(二) DNA 连接酶

DNA 连接酶在大肠杆菌及动植物细胞中都有存在。它催化一个寡核苷酸或多核苷酸的 5'-磷酸端和另一寡核苷酸或多核苷酸的 3'-OH 端相互作用 形成磷酸二酯键; 它可催化双链 DNA 或杂交聚合物——聚核糖核酸: 聚脱氧核糖核酸中任一 链上的单股断裂连接起来。

DNA 连接酶催化时, 必需经过一个酶——AMP 中间物, 这中间物的形成在大肠杆菌中需要 NAD⁺ 提供 AMP, 而在哺乳动物则由 ATP 提供 AMP。酶与 AMP 间的结合 是由酶的一个 ϵ -Lys-NH₂ 与 AMP 形成磷酸胺键。反应可示如图13-9。

从图13-9可以看出, 连接酶的催化作用首先是酶催化部位的一个赖氨酸 ϵ -NH₂ 对 NAD⁺ 或 ATP 嘌呤核苷酸的磷原子进行亲核攻击, 形成连接酶-AMP 中间物。其次是单股断裂 DNA 的 5'-磷酸上的 氧对酶-AMP 中间物 AMP 上的磷原子进行 亲核攻击, 使单股断裂 DNA 的 5'-磷酸与 AMP 的磷酸基形成酸酐键, 形成第二个中间物, 并把连接酶释放出来。最后, 这个中间物上单股断裂 DNA 3'-OH 氧亲核攻击 5'-磷酸基团而形成磷酸二酯键, 把断裂的 DNA 连接起来, 并释放 AMP。形成磷酸二酯键所需的能量由 5'-磷酸和 AMP 间磷酸酐高能键所释放的能量来供给。

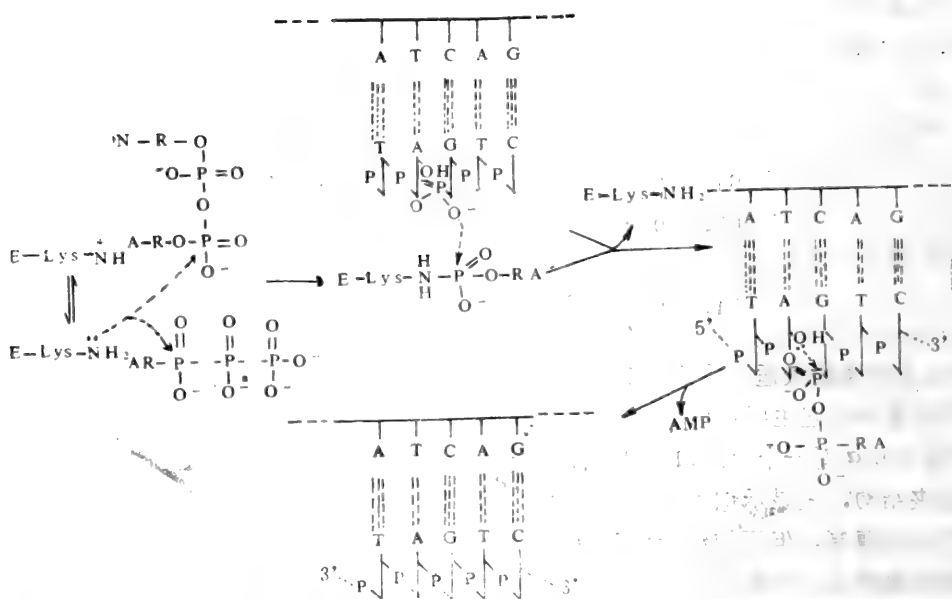


图13-9 连接酶催化 DNA 链连接反应

大肠杆菌每个细胞约含300个连接酶分子。它们在30℃下每分钟可封闭约7500个断口，而大肠杆菌 DNA 复制时估计每分钟只大约产生200个断口，所以连接酶是大大超量的。在真核细胞中有两种不同的连接酶定位于核中，它催化磷酸二酯键的合成与原核细胞中的相同，只是需以 ATP 代替 NAD^+ （见图13-9）。

（三）螺旋去稳定蛋白(Helix destabilizing protein)HDP

这个蛋白又称 DNA 结合蛋白(DNA binding protein, DBP)，这是一组蛋白质的总称。第一个被鉴定的 HDP 是由 T_4 -噬菌体基因32编码的，后来发现它与 T_7 噬菌体感染的大肠杆菌和未经噬菌体感染的大肠杆菌中分离的 HDP 相同。它们都能在 DNA 的熔化温度以下使 DNA 双链转变成单链。该蛋白质 $M \cdot W = 35,000$ 道尔顿，可紧密地、协同地结合于 DNA 单链区，每个蛋白质分子约可覆盖十个核苷酸单位。每个大肠杆菌细胞大约有300—800个 HDP 分子，这个 HDP 能使复制叉前面的 DNA 双链更易解开，形成 DNA 复制的单链模板。

纯化的 DNA 聚合酶在一特殊情况下可被存在于其补链上的 HDP 所刺激，而且这种刺激专一性很强。 T_4 -HDP 只能刺激 T_4 DNA 聚合酶； T_7 -HDP 只能刺激 T_7 -DNA 聚合酶，而大肠杆菌的 HDP 只能刺激大肠杆菌 DNA 聚合酶Ⅰ和Ⅱ，但不能刺激 Pol I。

从大肠杆菌和 T_4 感染的大肠杆菌细胞中分离的 HDP，在 DNA 复制、重组和修补中都起作用。但由噬菌体 M_{13} 基因与所编码的 HDP，则通过稳定后代病毒 DNA 单链，在阻止 DNA 进一步复制上起主要作用。真核细胞中也存在 HDP，在活体内，它们的作用可能就是稳定单链 DNA。

（四）DNA 解链蛋白或解螺旋酶(DNA unwinding protein or DNA helicases)DH

这类酶至少有四种，它们象 HDP 一样具有解开双链 DNA 的功能。但又与 HDP 不

同，在催化解链时要有 ATP 水解 供能。

大肠杆菌中的 DHI 为一种纤维状蛋白, $M \cdot W = 180,000$ 道尔顿, 大约有 80 个分子结合于靠近复制叉约 200 个核苷酸的单链区。它们能沿 DNA 运行使之解链。每个细胞约有 500 个 HDI 分子。

第二种叫 DH I, $M \cdot W = 75,000$ 道尔顿, 这个蛋白质很象基因 32 编码的 HDP, 该酶继续结合于它催化产生的 DNA 单链上。

第三种叫 Rep, 是主要用于复制小噬菌体 ϕ X174 和 G4 的蛋白质, 但推测在寄主细胞 DNA 复制中也起作用。它类似于 DH I, 并经常与 HDP 一起作用, 解开部分单链化的 DNA 双链。它结合于单链区, 且以 3'→5' 方向移动, 直到双链 5'-端解链为止。每解开一个核苷酸需要水解掉两个 ATP, 而 HDP 则继续结合于其解开的单链上。

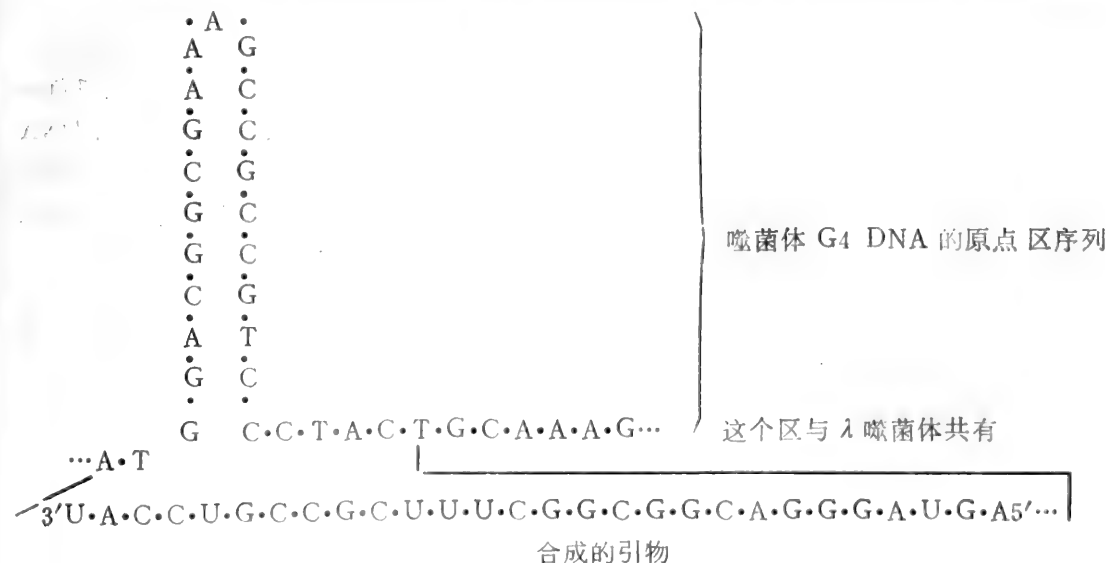
第四种 HD 称为 DHⅢ, $M \cdot W = 2 \times 20,000$ 道尔顿。类似于 Rep, 但它以 5'→3' 方向沿所结合的 DNA 移动。它和 Rep 在复制叉上一致行动。

此外还有一些蛋白也类似于需 DNA 的 ATP 酶。它们一旦结合到 DNA 上就能推动自己沿 DNA 链移动,除了起解链作用外,还能合成 DNA 复制所需的专一性引物。

在哺乳动物中，也分离得到了一个需 DNA 的 ATP 酶，它与 HDP 一起作用，刺激 DNA 聚合酶 α 的活性。

(五) 引物酶(Primase)

大肠杆菌 RNA 聚合酶, 在起始噬菌体 M₁₃ 和大肠杆菌 DNA 的复制中催化引物合成。但在大肠杆菌系统中的所有其它实例中, 观察到了另一种酶在引物合成中起作用, 称为引物酶。如 dnaG 基因产物在噬菌体 G₄ 和 ϕ X174 等小的单股 DNA 复制中具有催化引物合成的作用, 它在岗奇片段合成中, 也催化引物合成。噬菌体 T7 基因 4 的产物, 也具有催化引物合成功能, 催化合成专一性四核苷酸引物—ACCA。在大肠杆菌 HDP 存在下, 在单股噬菌体 G4 DNA 上, 引物酶能合成一个含 29 个核苷酸的 RNA 引物, 如下式。有些引物酶能催化寡聚 RNA 和寡聚 DNA 混合引物的合成。在真核细胞中, 有证据表明存在同样的引物酶。



(六) 切开合拢酶(Nicking closing enzyme)或拓扑异构酶 I (Topoisomerase I)

双链 DNA 解链必需绕轴旋转, 每旋转一圈只能解开10个碱基对。按 DNA 复制时的解链速度计算, DNA 在解链时必须以每分钟转10,000 圈的速度旋转才能达此目的。而对闭环 DNA 则又不可能旋转。为此 Cairn 第一次提出了旋转装置(Swivel)这个名称, 并设想这旋转装置可能是通过一个内切核酸酶和一个切口闭合酶而起作用的。后来在大肠杆菌中确实分离出了一种酶, 它具有以上两种功能。它首先是在 DNA 双链的一股上切开一个切口, 酶在切割 DNA 后并不从切端释放。但这时 DNA 的两股可相互旋转, 同时该酶切割 DNA 产生的 5'—OH(可被多核苷酸激酶磷酸化)随时仍可保持与3'—磷酸的结合, 而且这种结合不象连接酶的催化作用, 它不需要 ATP 供能。其结合的推动力是双股 DNA 的张力, 这种张力是在解链时释放备用。该酶也能使环状超螺旋解链。该酶作用的直接证据是当 DNA 在 $H_2^{18}O$ 中进行复制时, 现察到 ^{18}O 参入 DNA 母链中。可见 DNA 是先经水解切开, 待双链经旋转而松施后, 该酶又把切口连起来。其机制可示意如图13—10。

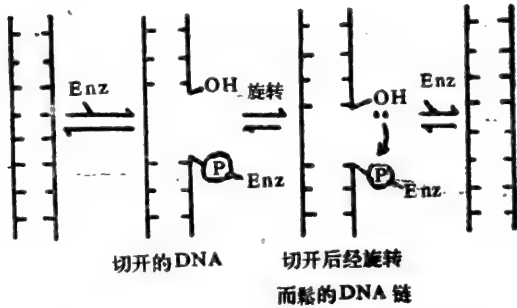


图13—10 DNA 拓扑异构酶 I 作用示意图

acid)和 Oxalinic acid 敏感。全酶 $\alpha_2\beta_2$ $M \cdot W = 400,000$ 道尔顿。

回旋酶是在 DNA 上一专一性部位交错切割, 如 T \overline{G} NYN。切下后在适当条件下它可保留于切口的 5'—端。
ACNRN

该酶允许 DNA 旋转, 使之向有利于模板股向解链方向能动地扭转, 使 DNA 在复制过程中解链。一般认为, 它既能起除去复制期间引入 DNA 中的正超螺旋圈作用, 也能把负超螺旋圈引入到复制叉前面的 DNA 上的作用。这样使复制时解链更为迅速。回旋酶使 DNA 扭转是与 ATP 水解反应相偶联的。也是造成染色体形成超螺旋的原用, 它可使细菌细胞所有的环状 DNA 保持超螺旋形式。有人认为回旋酶是通过一种“符号翻转机制”改变 DNA 的拓扑性质而起作用的, 因此引入了拓扑异构酶这一名称(机制示如图13-11)。

从图13—11—I 示意图看出, 上下两个扭转符号相反。一个环状 DNA 进行扭转时, 当上面形成正扭曲时, 下面必定是负扭曲, 这样才能使净扭曲为零。而在图13—11—II 中, 后面被切成的 DNA 两个末端, 可跨过未切的 DNA 链转移到前面来。这样在前面重新连接的 DNA, 就成为含两个负扭曲的分子(13—11—IV)。

要产生上述符号的翻译必需有三个条件。①回旋酶必需结合于两个远离的 DNA 链段上, 因此它至少应有两个结合部位。迄今都认为 DNA 分子环绕着回旋酶, 结果使两个远离的链段并列在一起。②II 中被切断的两个末端, 必需保持在一起, 否则就会完全散开成为线

(七) DNA 回旋酶(Gyrase)或拓扑异构酶 II (Topoisomerase II)

DNA 回旋酶是一个四聚体蛋白, 其 $M \cdot W = 400,000$ 道尔顿。由两个 α ($M \cdot W = 105,000$) 和两个 β ($M \cdot W = 95,000$) 亚基构成。它们分别是由 *Cou'* 和 *nalA* 两个基因编码的蛋白质。前者是一个需 DNA 的 ATP 酶, 对抗菌素 Coumermycin 敏感; 后者是一个具有切开和合拢活性的酶亚基, 对苯啶酮酸 (Nalidixic

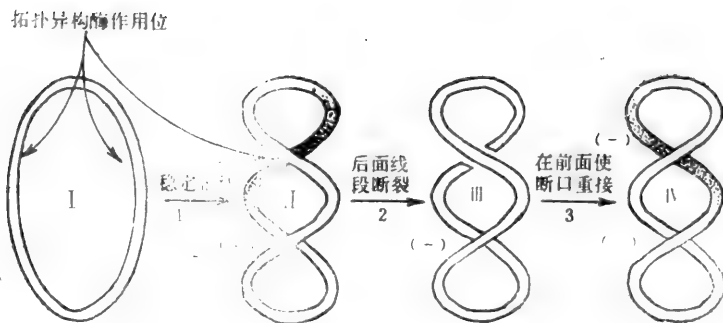


图13-11 回旋酶作用机制的模式

性 DNA 分子。这种维持在一起的作用，是由回旋酶的 α 亚基承担。图13-11-Ⅱ中 DNA 断裂的5'-P 端与回旋酶的一个 α 亚基共价结合。这一结合有两种作用，第一是使用两个切端结合到回旋酶分子上而不致远离；第二是使切割 DNA 磷酸二酯键所获得的能量贮存于 DNA —5'-P—回旋酶的连接键中，从而使翻转而重新连接 DNA 两个断端时，免去再激活步骤。

③把两个 DNA 断端从未切 DNA 链段的一边移到另一边需要移动能，这个能量由回旋酶 β 单体结合 ATP，以这种结合所诱导酶的构象变化来提供。但必须注意这并不意味着利用 ATP 水解的能量，它只是利用这种结合能；在切端重接后，ATP 才水解成 ADP 和 P_i 。ADP 不能长时间结合于该酶上，在切端重接后立即从 β -亚基上脱落，使酶恢复原有构象，准备在下一轮循环中再引入两个扭曲。所以 ATP 的功能，只作为构象循环变化的媒介，使得最后形成一个不能与酶结合分子。

回旋酶的这个作用机制，也能解释它所以能催化连环体的形成和解开这个可逆反应的原因(见图13-12)。另外在 DNA 复制时，如果回旋酶结合于正在生长中的复制叉之前，则它可最有效地通过引入负扭曲而解除正的超圈曲。

在真核细胞中，除线粒体外还没有回旋酶存在的证据。然而已发现了相似的酶活性。

四、DNA 的复制过程

DNA 的复制过程可分为起始，链延伸和链终止三个阶段。

(一)复制的起始

许多实验已证实，大部分原核生物和病毒 DNA，不管是线形的还是环状的 DNA 分子，都在一专一性部位起始复制。小 DNA 分子或大 DNA 分子的碎片，其复制起始部位可在电镜下观察到，它们以双股泡出现。复制泡起始于 DNA 上一个专一性部位。如线性 T₇ 噬菌体起始于从一端数起占核酸链全长的 17% 处；在质粒 ColE₁ 和 SV₄₀ 染色体中，其复制起始于离 EcoR₁ 切点固定的距离处；大肠杆菌的复制起始于靠近 *ilv* 基因的特定位点，即在标准基因 74° 的位置，向起始点两侧进行复制。

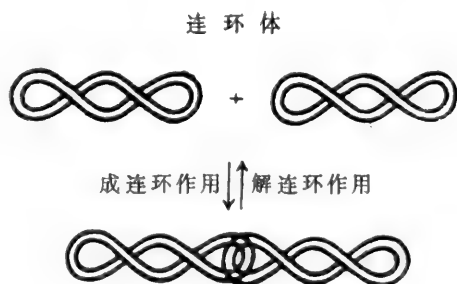


图13-12 连环体 DNA 的形成和解开图

真核细胞 DNA 复制时，显示大量的复制泡。放射自显影研究表明，哺乳类细胞 DNA 是由许多串联片段连接而成的，每个片段约长15~16nm，这些片段称复制子。复制从其原点双向分开进行。图13—13是含两个复制子的 DNA 的复制示意图。

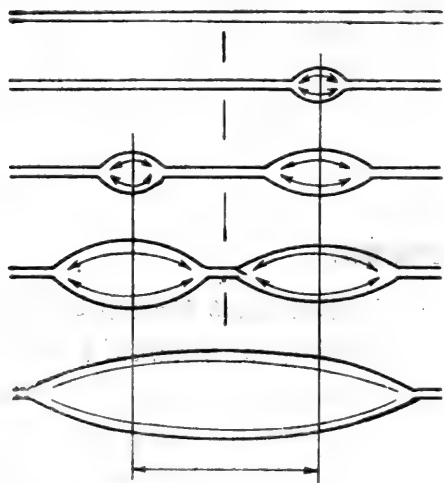


图13—13 哺乳类 DNA 复制示意图
这里只举了含两个复制子部位为例

DNA 复制的原点都有特殊的结构，有些原点已经列序，一些相关病毒和噬菌体的原点常显示有较大的序列同源性。原核细胞 DNA 复制原点具有引物酶作用部位，在那里 DNA 为了适应复制的起始，常有一段回文结构，便于形成一双股发夹结构。如 G_4 复制时，所有单链都与 DNA 单链结合蛋白结合，唯有发夹形结构区没有被该蛋白结合。这个区域就成为引物酶催化 RNA 引物合成的模板。随后由 DNA 聚合酶 III 从 RNA 引物延伸以合成 DNA (如图13—14)。M₁₃ 噬菌体 DNA 复制的起始区也有发夹结构形成区，但合成引物 RNA 不是由引物酶完成，而是由大肠杆菌的 RNA 聚合酶完成，而且起始引物合成还需要其它一些未知蛋白。

迄今研究过的最复杂的起始系统是噬菌体

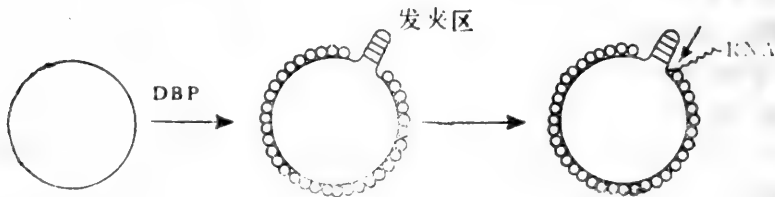


图13—14 G_4 DNA 复制起始的发夹区

ϕ X174的起始系统。它也是与大肠杆菌 DNA 合成最近似的系统。它的起始区没有发夹结构，它由引物酶合成引物，但引物合成的第一步需要形成一个复合物(前引物体)。这个前引物体(Preprimosome)包含六种蛋白，即 n 、 n' 、 n'' 、 i 、 $dnaB$ 和 $dnaC$ 。 n' 蛋白结合于 DNA 单链区，且与一个 ATP 分子结合。然后引物酶与前引物体结合形成引物体。蛋白 n' 利用 ATP 水解释放的能量，使引物体沿 DNA 移动到一个被选择的引物部位。虽然这个被选择部位还不很清楚，但已知 $dnaB$ 蛋白在该部位改变了 DNA 的结构，而且这一改变将促进引物酶合成 RNA 引物。

大肠杆菌 DNA 复制原点已被克隆和列序。它含有许多终止密码，并带有回文结构，与噬菌体结构类似。大肠杆菌中有一膜蛋白在 DNA 正常起始前15分钟合成，从大肠杆菌中已分离出合成该蛋白的 ori RNA，但在 $dnaB$ 温度敏感的大肠杆菌突变体中则无此 ori RNA 形成。又发现 $dnaC$ 的基因产物可使 ori RNA 起始后转向 DNA 的合成，而 $dnaC$ 的温度敏感突变株不能起始 DNA 复制的新周期。

此外还发现有 dnaJ、dnaP、dnaK 等基因产物，它们也是染色体复制起始所必需的。

(二) DNA 复制的方向

DNA 复制在一特定原点形成复制泡后，接着复制泡向两边扩展形成两个复制叉，然后双向复制。但亦有少数例外，如 ColE1 的复制是单向的。在另外一些情况下，复制泡向两边的扩展不是等长度的，如 R₆K 的复制，一个复制叉向原点左移20%，另一复制叉向右移80%。真核 DNA 复制时则是许多复制泡同时向两边扩展(图13—13)。

(三) 复制时链延伸的方式

DNA 是由两条反向链结合而成的，一条链以3'→5'延伸，而另一条则由5'→3'延伸。起初人们推测复制时两个子链的生长方式可能不同，一个可能是向3'一端逐个加入5'—核苷酸，而另一条可能是向5'一端逐个加入3'—核苷酸。但一系列事实否定了后一种链生长方式。理由如下。

对 DNA 聚合酶的专一性进行研究的结果表明：它们都只能把 5'—dNTP 中的 5'—dNMP 加到正在生长链的(引物的)3'—OH 上。而从未发现任何能使 3'—dNTP 聚合成 DNA 的酶，且 3'—dNTP 这样的底物也未曾在任何细胞中找到过。

如果是 5'—dNTP 的 3'—OH 加到正在生长链的 5'—P 端上，则生长链的 5'—端应为三磷酸，但这样的 5'—磷酸终端的引物是与 DNA 聚合酶的校对功能相矛盾的，它将被 DNA 聚合酶的 5'→3'外切功能所切去，聚合功能就会停止。

鉴于以上的两种理由，可以肯定，在 DNA 复制时，链的延伸方式是由引物 3'—OH 端逐个加入 dNTP 聚合而成 DNA，即链的生长是由 5'→3'而不可能从 3'→5'。那么，DNA 另一条链的复制又是怎样从复制叉起始而复制的呢？

Okazaki 经一系列实验提出，DNA 的两个子链以相同方式合成，但其中一股向复制叉方向，从 5'→3'合成，而另一股的复制则是从反复制叉方向，也是从 5'→3'，先合成许多短片段，最后把这些短片段连接起来而成长链-DNA(如图13—15)。以这后一种方式进行 DNA 复制时，复制叉附近的母链有单链区，这些单股 DNA 区可能与 HDP 或 DNA 解链蛋白等结合而得以稳定。从电镜中可以观察到这些单链区的存在。人们称向复制叉方向生长的链为前导链(Leading strand)，而称反复制叉方向生成的链为后随链(Lagging strand)。

(四) DNA 复制中冈奇片段的存在、起始形式和生长方向

上面已经提到，后随链复制时是先合成小片段，这小片段是由冈奇提出的，所以称为冈奇片段(Okazaki pieces)。这些冈奇片段已从氘化胸苷标记的大肠杆菌的 DNA 中和 T₄ 感染的氘胸苷标记的大肠杆菌 DNA 中分离获得。它们在缺乏连接酶和 DNA 聚合酶 I 的大肠杆菌中可累积。

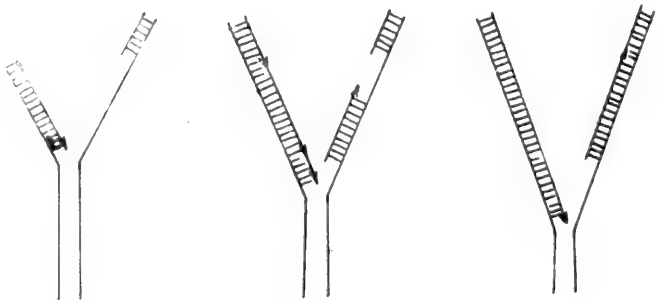


图13—15 DNA 两股的复制机制示意图。

有人使 T₄ 噬菌体在 8℃ 生长，以减慢其 DNA 的合成速度。先用 ¹⁴C 胸苷保温150秒钟

后用 ^3H 胸苷保温 6 秒钟，分离的冈奇片段显然只在 3' 一端的才含 ^3H 。用大肠杆菌 外切核酸酶 I (从单链 DNA 3' 一端降解 DNA) 降解 冈奇片段，发现 ^3H -标记的 dNMP 在 ^{14}C -标记的 dNMP 之前释放。而用枯草杆菌核酸酶 (从 5' 一端降解 DNA) 降解 冈奇片段时，则 ^{14}C -dNMP 比 ^3H -dNMP 先释放。从而 证实冈奇片段的合成是由 5'—3' 延伸。这支持了它是以不连续形式合成的假设。

冈奇片段合成的起始可用下列几个实验予以说明。

① 大肠杆菌 RNA 聚合酶的抑制剂——利福平能抑制 M_{13} 噬菌体和某些质粒 DNA 的复制。但含抗利福平 RNA 聚合酶的突变体的 DNA 复制正常。且利福平只阻碍大肠杆菌复制新周期的起始，而不阻碍已生长的 DNA 链的伸长。这充分说明 冈奇片段的 合成，是先由 RNA 聚合酶催化一个 RNA 引物的合成，然后以 RNA 引物的 3'—OH 接受 dNTP 的一个 dNMP 而起始的。

② 发现了 dnaG 基因的产物——引物酶，它在 RNA 引物合成中起作用。证明冈奇片段的合成也是先合成 RNA 引物。

③ 从原核和真核生物中分离得 5' 一端含寡核糖核酸的冈奇片段。用多核苷酸 激酶处理使其 5' 一端磷酸化，然后用碱或核糖核酸酶 处理，从 5' 一端切除 RNA，剩余 DNA 含 5'—OH，再用核苷酸激酶和 ^{32}P -ATP 处理，测得去 RNA 的冈奇片段含 ^{32}P 。用脾磷酸二酯酶 催化它水解，得 3'—dNMP，这说明 RNA 大片段与 冈奇片段 5' 一端相连。这可从下图说明 (图 13—16)。

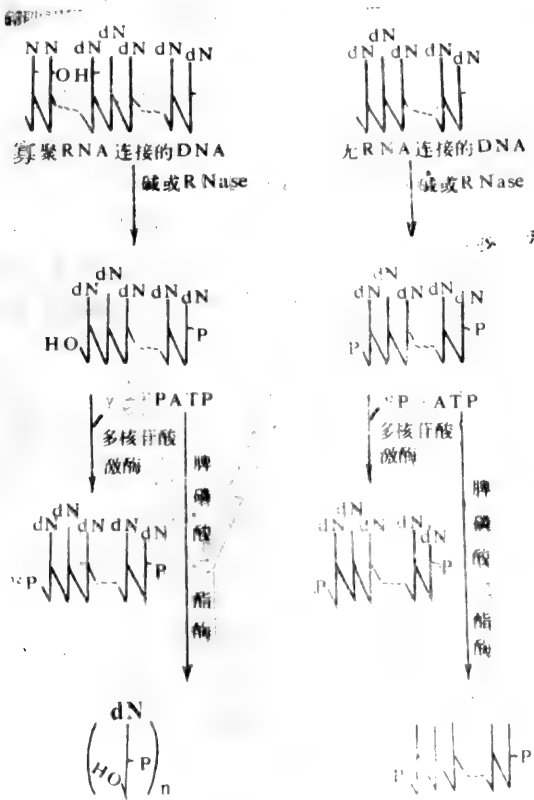


图 13—16 证实有寡核糖核苷 连接在冈奇片段 5' 一端的反应

④连有寡聚 RNA 的岗奇片段，在缺 DNA 聚合酶 I 的大肠杆菌突变体中可以累积。在合成 DNA 时，用 ^{32}P -dNTP 为底物，渗入到大肠杆菌细胞膜中，再用甲苯处理分离岗奇片段及用碱水解后，发现有 ^{32}P 从 DNA 转移到核糖核苷酸上。说明有一个 ^{32}P 在 RNA 和 DNA 间构成了 ^{32}P 桥，用碱水解时，这个 ^{32}P 桥转到移 RNA 的 3'-核糖核苷酸上，如图 13-17。

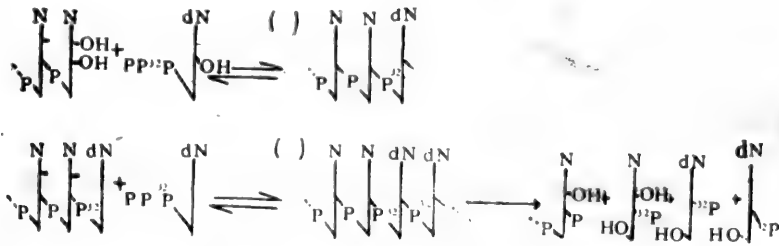


图13-17 岗奇片段的合成示意图

它是从 RNA 引物 3'-OH 端逐个参入 dNMP 延伸而成

从引物酶的研究，说明岗奇片段起始于后随链的一个特殊部位，那是引物酶优先结合的甲基化腺苷酸部位。

(五)DNA 的连续复制

DNA 复制时，其后随链是不连续的，要通过先合成 RNA 引物再合成岗奇片段，已如上述。但其前导链的合成应该是连续的。在 DNA 迅速合成的条件下，新生 DNA 确实有大片段也有小片段产生。但当 dNTP 底物受限制时，DNA 链的生长变慢，这时两条链似乎都以不连续方式合成。

虽然前导链和后随链都以不连续方式合成，但现已证明二者的合成机制不完全一样，后随链的岗奇片段，一直到它完全合成后才能被连接，而前导链的岗奇片段，则一边延伸一边就和前面的生长链相连接。后随的链的岗奇片段的起始，必须在复制叉附近有相当长的单链区存在时才有可能，而前导链则不必。前导链岗奇片段的连接很快，在引物除去并且连接不受阻碍的情况下，在前导链上检测不出其不连续性。

(六)DNA 复制过程的总结

DNA 复制首先是在 DNA 上有一定结构的原点形成复制泡，然后由拓扑异构酶 I 和拓扑异构酶 II 帮 DNA 双螺旋解链，形成复制叉。复制叉形成后，HDP 即结合于被解开的 DNA 单链上，使单链稳定。两种拓扑异构酶再使复制叉向前移动。引物酶结合于复制叉附近，催化合成一个 RNA 引物。然后由 DNA 聚合酶(在大肠杆菌及一些噬菌体中为 DNA 聚合酶 III 全酶，在真核生物中则为 DNA 聚合酶 α)从引物 3'-OH 端逐个参入 dNMP，其方式是引物的 3'-OH 氧亲核攻击 dNTP 的 α -P 原子，脱去一个焦磷酸而形成磷酸二酯键。新合成的子股，一般是以母 DNA 的一股为模板，以 5'→3' 方向，向复制叉移动方向连续合成，或先合成小片段再连成长链，合成后，靠拓扑异构酶 I 旋转切割并重接成双螺旋。另一子股则以反复制叉方向，也以 5'→3' 方式合成，但合成完全是不连续的。它只有在复制叉附近有较长单链区暴露后，才能结合引物酶。先合成引物，紧接着合成岗奇片段。当岗奇

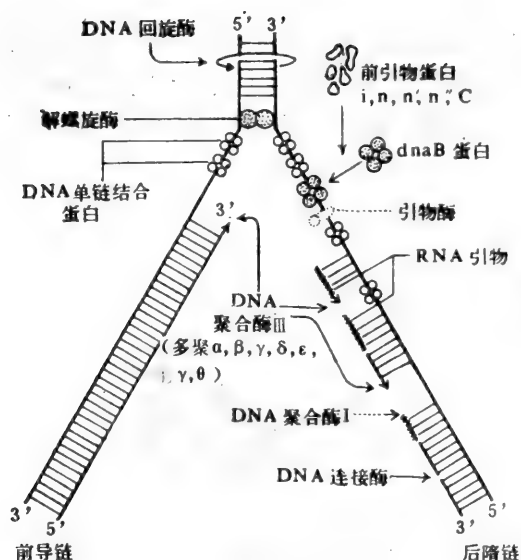


图13-18

DNA 复制的总图(包括各种酶在内)

片段延伸到前一个冈奇片段的 RNA 引物时, DNA 聚合酶 I (大肠杆菌) 的 5'→3' 外切核酸酶活性起催化作用, 把 RNA 引物除去, 并按模板指令与一个个 dNTP 反应, 再由 DNA 聚合酶 I 催化逐个参入相当的 dNMP, 把 RNA 消去的缺口补上。缺口补满后由连接酶催化把 3'-OH 端与前一个冈奇片段的 5'-磷酸端连接成磷酸二酯键。图13-18示出了 DNA 的复制过程及与复制有关的各种酶。

五、DNA 合成模式实例

(一) 单股病毒 DNA 的复制

小噬菌体如 fd、G4、 ϕ X174 在大肠杆菌细胞中的复制约分三个阶段进行。但由于它们的 DNA 序列不同, 故在复制的一些步骤上也不完全相同。

1. 以原有的环状 DNA 分子(病毒正链)为模板合成互补负链

当噬菌体进入寄主大肠杆菌中时, 其 DNA 分子被大肠杆菌的 DCP 覆盖。但 fd DNA 中仍有裸露的发夹结构圈, 能结合 E. Coli RNA 聚合酶。该酶合成一个短链 RNA, 作为复制病毒负链的引物, 从而进一步合成负链。在 G₄ 中也有类似的裸露 DNA 链段, 它是引物酶的结合部位。由引物酶负责合成 RNA 引物。该引物酶在 DNA 上的结合原点序列及所合成的 RNA 引物序列已在引物酶一节介绍过。

在 ϕ X174 噬菌体中既无 RNA 聚合酶结合部位, 也无引物酶结合部位裸露。其环状单链的复制首先是由 dnaB、dnaC 的产物及 i、n、n'、n' 等蛋白质形成一蛋白复合物, 称 dnaB 复合物。该复合物与引物酶作用形成引物体 (Primosome)。它能利用 ATP 水解释放的能量沿 5'→3' 方向环绕 DNA 链移动。引物体移至适当位置, 即起始一 RNA 引物的合成。一旦引物合成起始, dnaB 复合物即自由离去, 重新与另一引物酶结合, 但在起始另一引物之前, 它至少要运行 200 个核苷酸的长度。大约要合成 6—8 个引物, 方可完成一 DNA 的合成。

上述三种噬菌体所形成的 RNA 引物, 就成为 DNA 聚合酶 III 合成 DNA 的引物。但在 DNA pol III 合成 DNA 之前, 延长因子 I (EFI) 必需与 dnaI 蛋白 (EFI)、延长因子 II 和 ATP 等经一系列反应而结合, 然后才能使 DNA pol III 结合到延长因子 I 上, 使一个个 dNTP 加上去合成 DNA 链。当生长的负链 3'-OH 端到达下一个 RNA 引物处时, DNA pol I 即取代 DNA pol III, 切除 RNA 引物, 并把空隙补上完成 DNA 链的合成, 最后由连接酶连结完成整个负链的复制。整个过程如图13-19所示。

2. 噬菌体负链的复制

三种噬菌体负链的复制的起始都需要一专一性噬菌体编码的蛋白质介入。该蛋白在正链

DNA 上造成一个切口，在 ϕ X174 负链复制中该蛋白称为 CisA 蛋白，在 fd 中则称为 gene I 核酸酶。正链被切后，该蛋白仍结合于切口的5'-端。而 3'-端—OH 则作为 DNA 聚合酶 III 全酶的引物，以负链为模板合成正链（图13—20）。DNA 的解链是由解链蛋白 Rep、CisA 和 DBP 三者一起作用 而完成， 迴旋酶也可帮助解链。

由于正链以原正链切口的 3'-OH 端为引物而开始合成，故切口的5'-端与DBP 结合后就会剥离滚动的负链，使负链成为合成正链的模板。直到正链 合成一周，RNA 聚合酶结合部位暴露， 负链 合成即又开始。而 G_4 中当正链合成一半时， 引物酶结合部位即暴露， 负链 合成 也就开始。

在正链合成完成一周后，在正链 5'-端的 CisA 蛋白质重新结合到其作用部位，这时它的作用是作为一个拓扑异构酶，从而释放出一个完全环状的正链，带有一个或更多个正在生长的负链，并又在新的滚动环上起始正链合成。

最后一步是要合成噬菌体编码的蛋白质，它阻止重新起始负链的合成。因此复制型分子继续合成正链。

(二)双股 DNA 病毒的复制

有三种噬菌体 λ 、 T_7 和 T_4 和动物病毒SV₄₀、多瘤病毒、腺病毒等的复制已广泛研究过，其中无共同规律可寻，现介绍一些复制情况如下：

1. λ 噬菌体 DNA 的合成
 λ DNA 是线性分子，有粘性末端，引入寄主细胞后立即环化，然后在唯一原点进行双向复制得 θ 型。图 13—21 是双向复制法与单向复制对比图。

除寄主的作用外， λ 基因中 O 和 P 的产物为 DNA 复制起始所必需。P 基因的产物可代替 E·Coli 的 dnaC 基因产物与 E·Coli dnaB 产物作用形成复合物，再与 O 基因产物

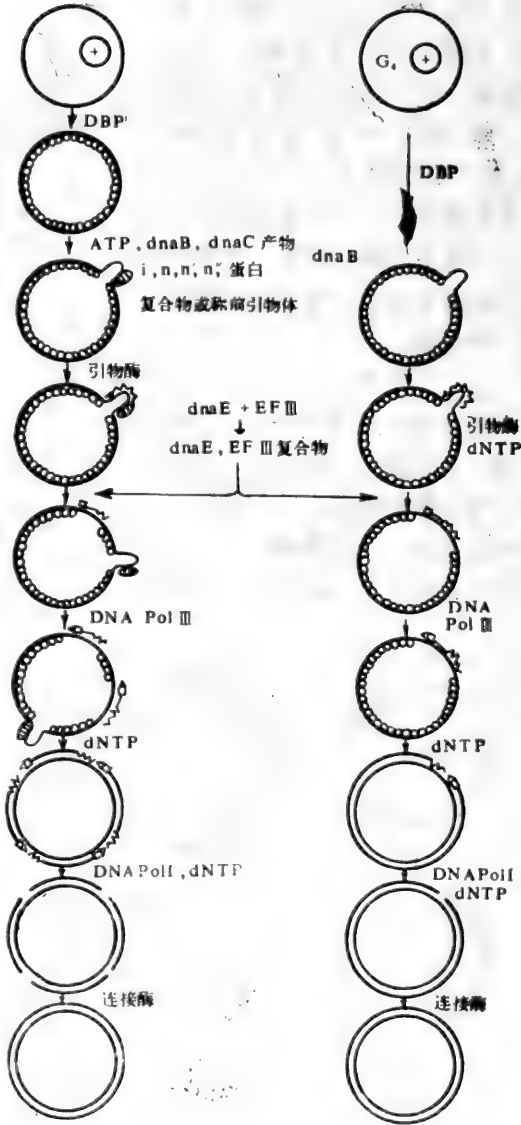


图13—19 单链 ϕ X174 和 G_4 正链的复制形成负链，生成双链 DNA

DBP 为 DNA 结合蛋白，
 □为EFI，
 △为DNApol III，
 ~~~为引物 RNA。

在专一性原点作用，使 RNA 聚合酶转录得一个单链 RNA。然后由引物酶合成一4SRNA分子(OOP)，它引导 DNA Pol III 催化 DNA 合成。另外 OOP RNA 也可被 RNA 聚合酶延伸导致一λ阻遏子的合成。

在寄主细胞控制下，λ 基因组可以融溶破碎而成寄主基因组和它们的复制物。

## 2. T<sub>7</sub> DNA 的合成

T<sub>7</sub> DNA 从分子一端 17% 处起始，首先形成一复制泡，双向扩展。当短侧复制完毕时，即形成一 Y 形复制体。在感染期产生一双分子长度的大分子叫连环体 (conca-

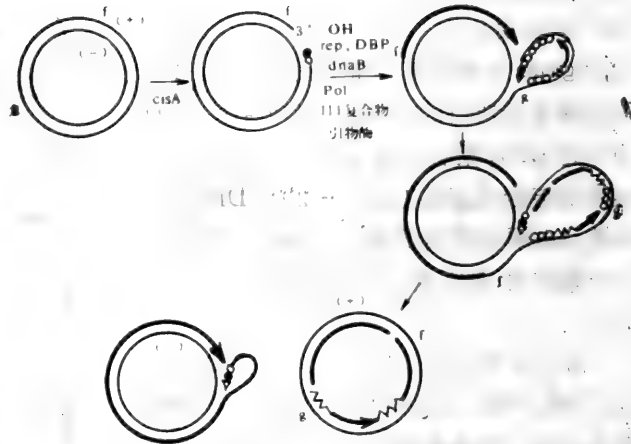


图13-20 ϕX174 (+) 链的复制

*g* 和 *f* 相当于噬菌体 *G*<sub>1</sub> 和 *fd* 的 DNA 单链上引物酶和 RNA 聚合酶的结合部位。

tamer)，那是两分子头尾相连而成的大分子(图13-22)。

这个噬菌体 DNA 的复制需要噬菌体基因1、2、3、4、5、6等基因产物。基因1的产物为一RNA聚合酶，是转录基因2—6所必需的；基因2的产物使寄主RNA一聚合酶失活；基因3的产物是一个内切核酸酶；基因6的产物是破坏寄主DNA的一个内切酶；基因5的产物和寄主硫氧还蛋白结合成DNA一聚合酶；基因4的产物催化一需ATP的解开DNA双链的作用，从而促进DNA一聚合酶的作用。因此这个复合物能催化从一个双链合成前导链。DBP和旋转酶进一步促进这一作用。基因4除作为解链蛋白外，也起引物酶作用。这是一个特殊的引物酶，它引导合成一个唯一的四核苷酸  $pppACC^C_A$ 。这个

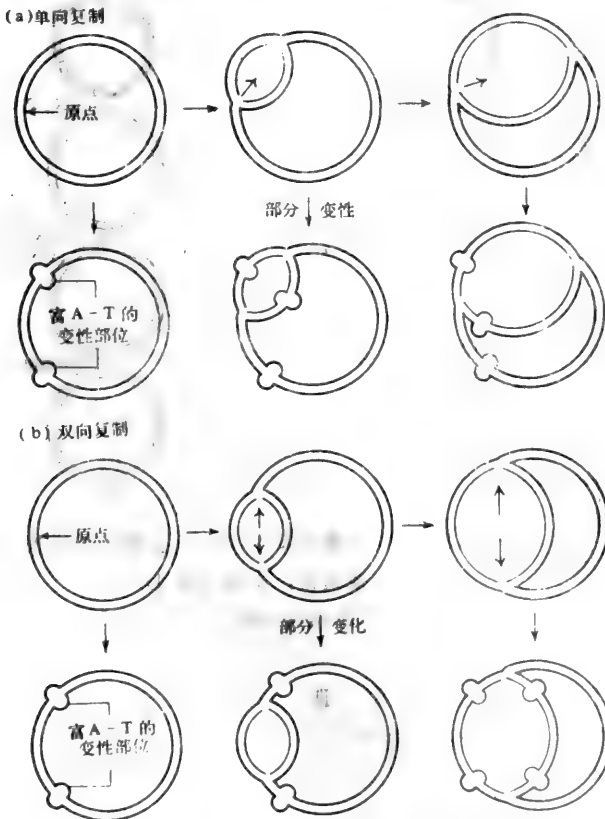


图13-21 环状双链 DNA 的双向复制  
(与单向复制对比)



引物酶既可利用核糖核苷酸，也可利用脱氧核糖核苷酸作为底物，由模板指导合成产物，其合成频率决定于模板上四核苷酸 GGGT 和 TGGT 的频率。基因4和5蛋白物也能催化后随链上冈奇片段的起始和延伸。基因6的产物还具有外切核酸酶或寄主 DNA—聚合酶 I 的  $5' \rightarrow 3'$  外切核酸酶活性，可催化引物 RNA 的除去。冈奇片段的连接可由寄主 DNA 连接酶或  $T_7$  基因1、3编码的一个连接酶催化进行。

这个线性双链 DNA 的复制机中，后随链所形成的最后一个冈奇片段起始于模板  $3'$  端，当引物除去后，在一个新合成线性分子的  $5'$  端将留下一个单链尾巴（除去引物的部分）。这个单链尾巴是如何填补的呢？

James 和 Watson 等发现  $T_7$  DNA 末端都有260个核苷酸的相同序列，因此他们提出这不能复制的单链尾巴能以氢键配对方式结合到另一分子的同区域上形成一个约两分子长度的连环体，然后在连接酶作用下连接。基因3的产物是被挑选的一个内切酶，能在原有连接酶的对股上切出一个切口，使连环体重新分成两半。其后切口的  $3'$ -OH 端以切成的  $5'$  股为模板逐渐延伸，最后形成两个尾巴已补好的完整分子。整个过程如图13—22。

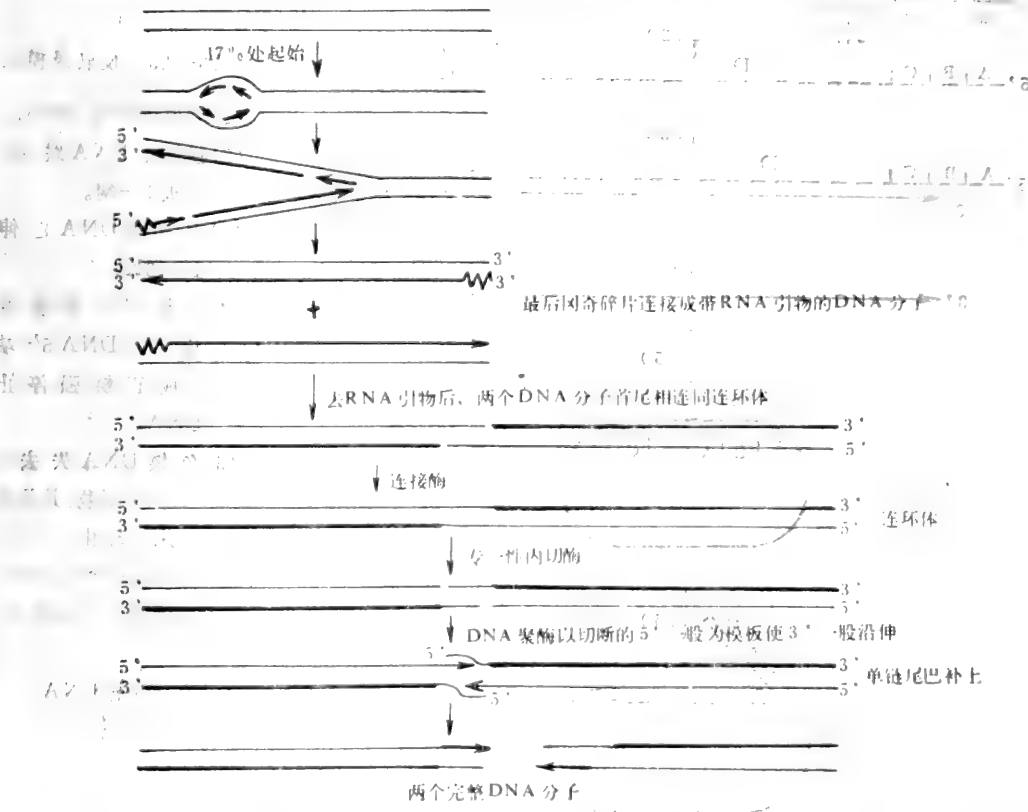


图13—22  $T_7$  DNA 的复制（连环体的形成及其作用）

其它病毒复制机制以及线粒体复制机制大至与以上所举实例相似，但复制所需的各种酶在各病毒中有其独特之处。

(三)反向病毒的复制

用打断氢键的试剂处理 70S RNA 病毒基因组，其 RNA 即解离成两个在遗传学上相等的 RNA 分子和几个 tRNA 分子。在病毒颗粒中存在独特的 RNA 指导的 RNA 聚合酶。该酶利用 tRNA 分子为引物，在单链 35S RNA 模板上合成 DNA。反应中间物是一个 RNA-DNA 杂交双链。该酶也显示核糖核酸酶 H 和需 DNA 的 DNA 聚合酶活动，使杂交双链转变为 DNA 双链。然后 DNA 聚合酶可继续催化 DNA 复制，以提供更多的 DNA 拷贝。该酶可结合到寄主细胞基因中。反转录作用的详细模式如图 13—23。这个机制能解释为什么所形成的双链 DNA 在两端比模板 RNA 长。也能解释反应期间为什么有短的正负链分子形成。

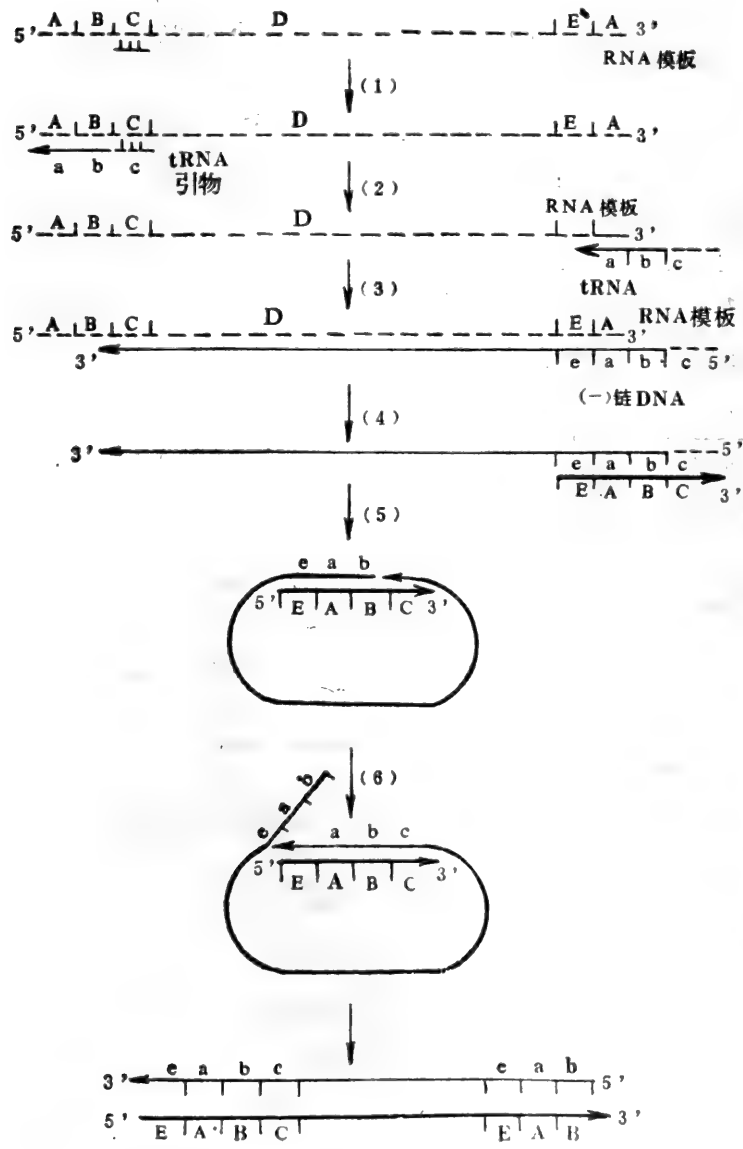


图 13—23 反转录模式

- (1) 合成强停止 DNA。
- (2) 强停止 DNA 跳到模板 3'-端。
- (3) 把 负链 DNA 延伸 到 8.3Kb。
- (4) 失去 RNA 模板 并 从 负链 DNA 5'-端 合成 正链 强停止 DNA。
- (5) 负链 DNA 失去 tRNA 引物 并用 粘性末端环化。
- (6) 负链延伸到 8.8Kb，从而排出 负链 5'-端。
- (7) 完成正链 DNA。

各种不同来源的反转录酶所用的 tRNA 引物不同。例如一个白血病病毒的反转录酶以 tRNA<sup>pco</sup> 作引物,它结合到病毒 RNA 上离 5'-端约 150 个核苷酸处,作为引物以合成 DNA 负链。当所合成的 DNA 达模板 5'-端时,合成即停止。此 DNA 称强停止 DNA 负链,这时它又跳到模板 RNA 3'-端,在那儿杂交成 50—60 个核苷酸的序列。多余的 90—100 个核苷酸序列伸展超过模板 RNA。这时强停止 DNA 负链沿模板合成正链 DNA。机制如图 13。23。正链 DNA 可作为模板合成病毒 RNA。但合成似乎在强停止 DNA 起始部位即停止。

## 第二节 DNA 的损伤和修复

本节介绍引起 DNA 损伤的途径以及细胞校正损伤的各种战略。

### 一、引起 DNA 损伤的途径

除了正常 DNA 复制所产生的少量偶然误差会产生 DNA 自发突变而引起 DNA 损伤外,主要的、大量的损伤来自以下几个方面。它们的频率远远超过自发突变的频率。

#### (一) 化学物质的诱变作用

主要的诱变物质有碱基类似物、烷化剂、抗菌素、染料等。

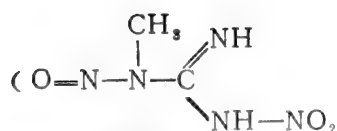
##### 1. 碱基和核苷类似物。

这类化合物主要是以核苷酸的形式参入 DNA 分子中,造成 DNA 的损伤或阻断 DNA 的合成。例如 5-氟尿嘧啶可转变 5-F-UMP,再转变为 5-F-dUMP,它抑制 dUMP 转变为 dTMP,因而抑制 DNA 的合成。这种抑制作用可通过加入 dTMP 或胸苷而得以克服。5-Br-尿嘧啶与前者不同,由于 Br 的范德华半径与 CH<sub>3</sub>-更相近,故 5-Br-尿嘧啶易于代替胸腺嘧啶参入 DNA 中。参入后它既可与 A 配对,也可通过互变异构形成烯醇式而与 G 配对,因而造成 DNA 复制时 GC 和 AT 间相互变化。5-氮脱氧胞苷能象胞苷一样参入 DNA 中,迅速干扰转录和翻译过程,使细胞改变生长特性。而胞-β-D-阿拉伯苷,可代替脱氧胸苷参入 DNA 中,使 DNA 合成链终止或显著降低 DNA 链的延伸速度。由于这些核苷类似物都能抑制 DNA 合成,故常用作抗癌药物。

##### 2. 烷化剂

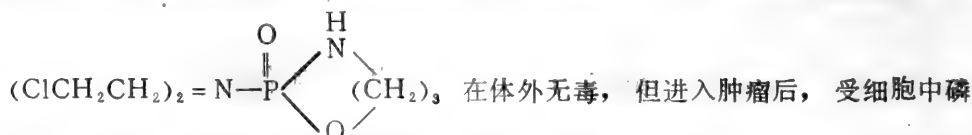
它们都有一个或更多个活泼烷基。常见的有硫介子气 (ClCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>S、氮介子气 (ClCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NCH<sub>3</sub>。它们对 DNA 的作用是复杂的。可使嘌呤烷化,特别是鸟嘌呤 N(7)。双功能烷化剂会使 DNA 分子中的反向链发生交联。鸟嘌呤烷化后即形成不稳定的四价氮,使遭烷化的鸟嘌呤离开脱氧核糖,从而使 DNA 链上留下一个缺口,进而干扰其复制或使错配碱基参入。DNA 的磷酸基也可被烷化而形成磷酸三酯,从而造成磷酸与糖之间键的断裂,使 DNA 链断裂。

烷化剂和致癌作用的关系是细微的。3-甲基胞嘧啶、3-甲基和 6-甲基鸟嘌呤烷化后会造 DNA 编码错误,引起癌症,而 7-甲基鸟嘌呤的烷化则不会致癌。良好的烷化剂如二甲基硫酸酯和甲基甲烷磺酸酯 (CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>) 等是较差的致癌剂,但 N-甲基-N-硝基-N-亚硝酸



对鸟嘌呤的烷化则相反。

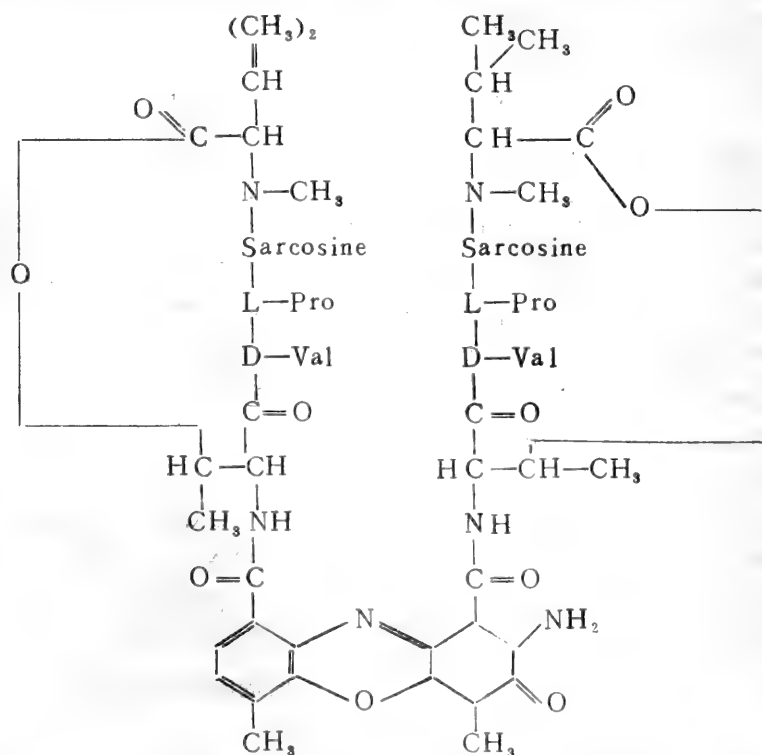
有些烷化剂非但不会致癌，反而能选择性地杀死肿瘤细胞，可用于治疗恶性肿瘤。如环磷酰胺



酰胺酶催化水解生成氧介子气。而癌细胞发酵作用旺盛，大量累积乳酸，pH 较低，一些酸性氧介子气易于进入其中，而不易进入正常细胞中。因而可有效地治疗癌症而对正常细胞无害。

### 3. 抗菌素

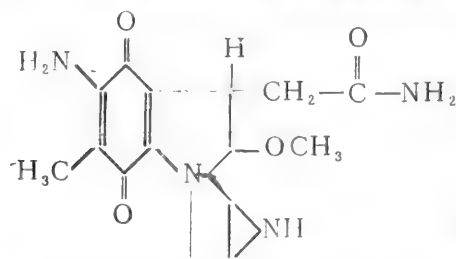
一些抗癌抗菌素对研究核酸合成，具有较大价值，如放线菌素 D( actinomycin D )，其结构为：



它和 DNA 中一个脱氧鸟苷形成复合物从而阻碍 DNA 作为模板，抑制 DNA 聚合酶的复制也抑制 RNA 聚合酶的转录。通常其在低浓度 (  $1.0\mu\text{m}$  ) 时即可使 RNA 聚合酶完全抑制，而要较高浓度才能抑制 DNA 聚合酶。根据放线菌素-DNA 复合物的 X-射线分析，推测放线菌素的芳香稠环，插入交替的 dG-dC 之间，由于 G 位于相反的两条链上，两个

G 的 2-NH<sub>2</sub> 与放线菌素环肽上 L-Thr 的  $\text{>C=O}$  氧成氢键结合，两个环肽则位于 DNA 双螺旋的浅槽中，这样就阻碍各种聚合酶对 DNA 的复制或转录。我国生产的光辉霉素的作用与此类似。

丝裂霉素 (mitomycin C) 也是一种抗癌抗菌素。结构为：



它抑制细菌 DNA 合成。在细胞中还原产生一活泼的双功能烷化剂，能与 DNA 上的鸟苷结合，使 DNA 的互补双链形成共价交联。其作用同双功能烷化剂。

链黑霉素 (streptonigrin) 也是通过抑制相应聚合酶活性而抑制 DNA 合成的。伊短杆菌素 (Edeine) 和茶啉酮酸等也都抑制细菌细胞 DNA 合成，但后者可能是抑制 DNA 拓扑异构酶 II 的作用。

#### 4. 染料

前黄素 (二氨基吡啶) 是通过其分子插入 DNA 分子中相邻核苷酸之间而引起码组移动突变。溴化乙锭也能插入 DNA 的核苷酸之间，插入后可形成一荧光络合物，此法可灵敏地测定 DNA 含量。

#### (二) 紫外线对 DNA 的作用

紫外线能使 DNA 链上相邻的胸苷残基形成共价键，从而形成胸苷二聚体 (如图 13-24)。二聚体的形成阻止聚合酶的作用，使 DNA 复制受阻。其它电离辐射，X-射线等也都能影响 DNA 合成。

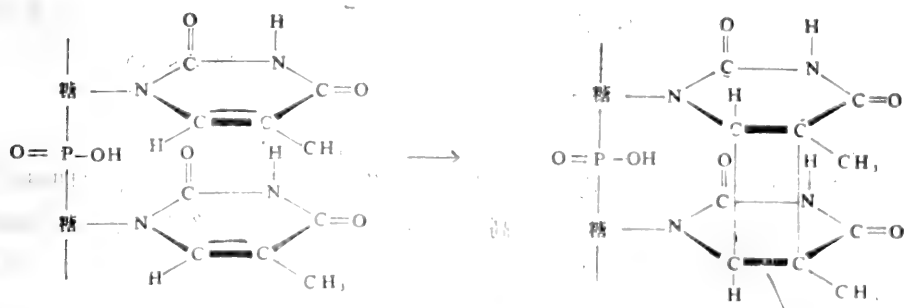


图 13-24 在紫外线作用下 DNA 链上胸苷二聚体的形成

## 二、DNA 损伤的修复

DNA 受损伤或合成时产生差错，必须迅速予修复。由于损伤或差错的类型不同，故有

不同的修复机制。

(一)光复活

当细菌被紫外光损伤后，暴露于强烈的可见光下，则大部分细胞可以恢复，这称为光活化。这种活化机制是由于可见光使一个酶活化，该酶能切割胸腺嘧啶二聚体，使该两碱基恢复其原有形式。在 *E. coli* 中这种酶为复活基因 (phr gene) 的产物，在真核细胞中也有相同的酶。

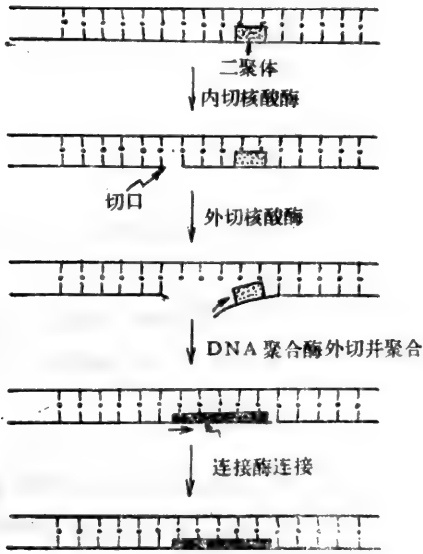


图13—25 DNA 紫外线损伤的切割修复

(二)切割修复

这一修复机制更复杂，是切去 DNA 的损伤链段，然后把切口补上。最普遍的修补机制分为四步进行。

①由于一个内切酶识别局部畸变或异常碱基，并切断其邻接的磷酸二酯键，使其 5'-侧引出一个裂隙，带有一 3'-OH 终端。视损伤的本质不同，参加内切核酸反应的酶也不同。胸腺嘧啶二聚体是由专一的识别特殊畸变的内切核酸酶识别，在 *E. Coli* 中这个酶称为内切核酸酶Ⅱ。在 *E. Coli* 中还有一个内切核酸酶Ⅴ专门识别含尿嘧啶的 DNA，也是切割异常碱基 5'-侧的磷酸二酯键。然而对含尿嘧啶、次黄嘌呤或烷化碱基更通用的修复机制的第一步，是用 N-糖苷酶除去糖—磷酸骨架上的碱基，成为脱嘌呤或脱嘧啶 DNA，然后再被一个内切核酸酶Ⅱ识别。在 *E. Coli* 中为内切核酸酶Ⅱ识别。

②第二步由一个酶切割裂隙的 5'-端链，其中包括嘧啶二聚体及畸变或异常碱基。在 *E. Coli* 中，内切核酸酶Ⅱ似乎与外切核酸酶Ⅲ相同，具有 3'、5' 外切核酸酶和磷酸酯酶活性，与 N-糖苷酶紧密联系。

③第三个酶是 DNA 聚合酶，利用完整的互补链为模板合成一段 DNA 片段填满缺口。

④第四个酶是连接酶，把新合成的 DNA 片段与断口连接，使 DNA 修复。

紫外线的损伤切割修复表示如图13—25。

(三)重组修复

如果在 DNA 复制以前，其损伤得以迅速准确地修复，则生物的遗传信息即得以完整地保持。这样的切割修复是很有效的，而且高度真实地插入了一小段修补片段。如果切割修复进行得很缓慢或完全缺失，如 UVr<sup>-</sup> 细胞或着色性干皮病患者和光化性角化病 (Actinic keratosis) 患者的细胞，其 DNA 损伤区就会遭受不正常的复制。当 DNA 聚合酶到达损伤处时，就会停止复制，而在与损伤相对的子链上留下一个缺口。这时 DNA 的修复就必须通过两个 DNA 分子重组才能完成修复。这一修补类型一般是通过另一 DNA 拷贝来供应预合成的碎片，此碎片取代缺失链段。关于重组模式见 DNA 重组一节。

### 第三节 DNA 重 组

DNA 重组是从两个母 DNA 分子产生新 DNA 分子的过程。新 DNA 分子带有两个母 DNA 分子所具有的遗传信息。重组 DNA 形成的途径可有以下几种：①两个病毒或质粒的混合感染。②真核细胞减数分裂期 DNA 被切断。③噬菌体、病毒或质粒 DNA 并入寄主细胞染色体中。④DNA 复制后修复等。

#### 一般重组

这种重组可以在两个互补 DNA 链的任何地方发生。在 *E. Coli* 中的一般重组，除依赖于其 DNA 复制所包含的酶和蛋白外，还要依赖于寄主的重组系统(rec)。

*recA* 蛋白在消耗 ATP 的情况下，能催化单链 DNA 退火成对应双链，这时它似乎作为一个解链蛋白导致 D 环形成（如图 13—26）。这个功能对接合转移或细菌转化所产生的单链 DNA 的整合是必需的，并且伴随着内切或外切核酸酶的作用而消去一些单链。如 *recBC*（外切核酸酶 V）可能有此功能。

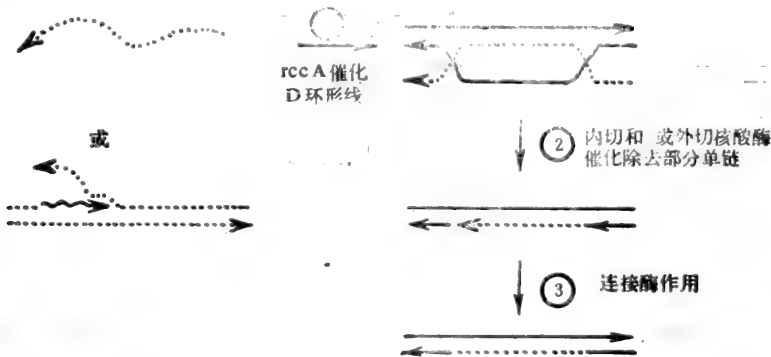


图 13—26 *recA* 在 DNA 重组中的作用

另一种单链形成是通过由双股 DNA 的一个裂隙发生股的置换（如图 13—27）。

在连接酶、DNA 聚合酶 I 或 dUTP 酶等的缺失突变体中有高速重组现象产生。在该情况下，DNA 中的裂隙（nicks）或切口（gapes）频率增加，可形成更复杂的异种双股重组体，这是通过股的交联和分支移动而造成的。

Holliday 预计首先是形成杂交体或异种双股区。随后在内切酶作用下形成第二个切口，并使断裂股与另一双链上的互补链配对。第二个切口的部位决定着原有母双链是否恢复或杂交 DNA 是否就是两个母链连接而成的双链。整个过程见图 13—27。

$\lambda$ —噬菌体的 *red* 基因编码 5'—3' 外切核酸酶 (*red*  $\alpha$ ) 和未知功能的  $\beta$ -蛋白 (*red*  $\beta$ )。外切核酸酶可作用于多余的单链，但首先作用于双链的 5'—磷酸端，产生带 3'—单链尾巴的产物，退火相应单链区。随后通过外切酶作用形成杂交分子，最后形成一完整的 DNA 分子（如图 13—28）。如果尾巴不切去，则能在内切酶和聚合酶参与下发生一倒易重组现象，

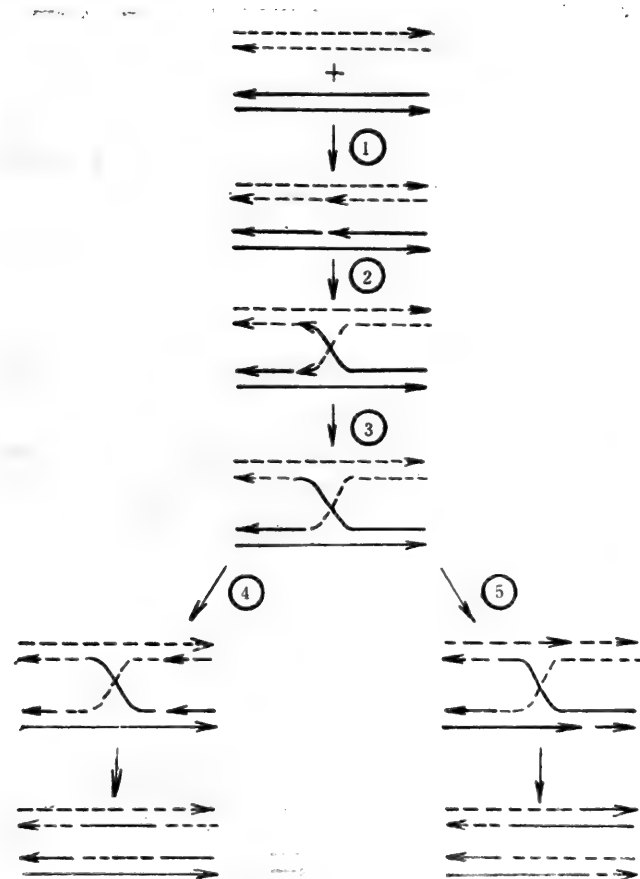


图 13-27 Holliday 的重组模型

①两个双链的相同股被切成裂隙：

②切断股与另一双链的互补股配对；③连接酶把接头连接；④在相同股的第二裂隙插入一个外来 DNA 短片，进入另一类似双链；⑤第二裂隙存在于双链的另一股上，最后的两个双链都是由每一母双链的一部位所导出。

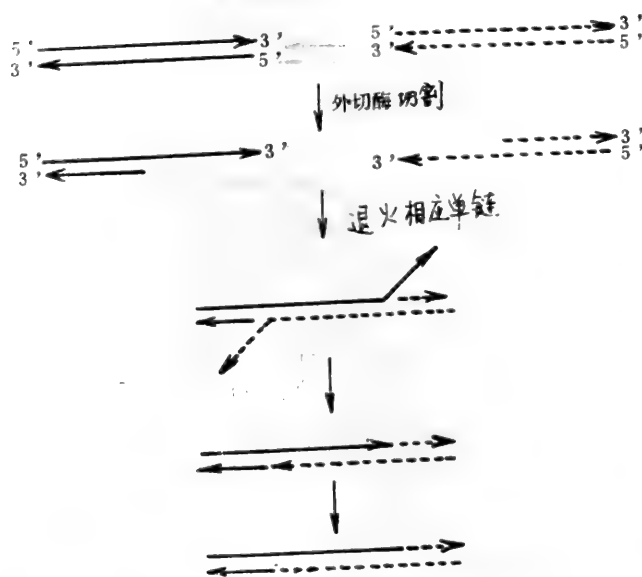


图 13-28 经入一外切酶作用产生搭接接头的分子

如  $T_7$  的复制。

## 二、部分专一性重组

在溶原性状态 (Lysogenic state) 下， $\lambda$ -噬菌体 DNA 插入细菌染色体一个专一性部位，在那里它以一特殊方向排列成行。这种作用属于部分专一性重组。它不需要一般重组的 *rec* 或 *red* 重组系统，而需要在噬菌体和细菌 DNA 两者中有一称为衰减部位 (*att-site*) 的专一性序列和一噬菌体编码蛋白。噬菌体 *int* 基因编码一个插入酶 (integrase)，该酶具有拓扑异构酶 I 的活性，它专一性地结合于带 *att*-部位的 DNA 上。噬菌



体 *xis* 基因编码一个蛋白，它与插入酶一起为一些切割作用（excision）所必需。

噬菌体  $\phi 80$  在 *att80* 一部位（近乳糖操纵子）插进 *E. coli* 基因组中，而  $\lambda$ —噬菌体则在 *att $\lambda$*  一部位（在 *gal* 和 *bio* 基因之间）插进去。在噬菌体和细菌的 DNA 上都有一个由三部分组成的 *att*—部位，前者为 *pop'*，后者为 *BOB'*。O 区为一个 15 核苷酸的序列，这在两个 DNA 中完全相同。当第一次重组作用产生时，两个 *att*—部位劈开，然后重结合成为 *Bop'* 和 *poB'*，O 区保持不变。 $\lambda$ —噬菌体上的部位专一性重组如图 13—29。

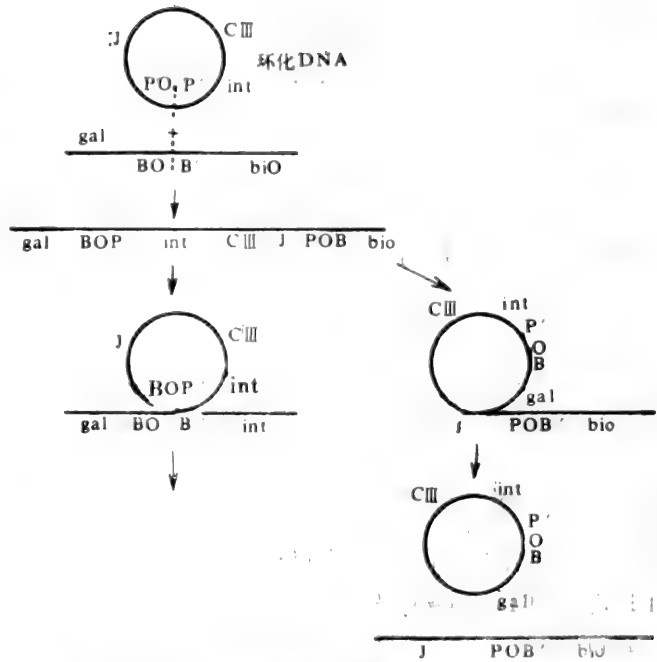


图 13—29  $\lambda$ —噬菌体上的部位专一性重组

## 第四节 RNA的生物合成

利用 DNA 的一股为模板，在依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶催化下，通过起始、延伸和终止等步骤合成 RNA，这一过程称为转录。转录首先应考虑两件事，第一是参与转录的酶，第二是在 DNA 分子上决定起始转录和终止转录的信号。

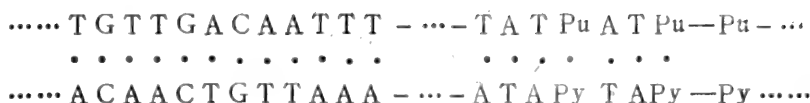
### 一、细菌 RNA 聚合酶的作用模式和结构

RNA 聚合酶最早是由细菌中纯化的。*E. coli* 中的 RNA 聚合酶是研究得最广泛的一个。其全酶是一个含 Zn 蛋白，在 6M 尿素中可解离成五个亚基（ $2\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\beta'$ 、 $\sigma$ ）。该酶  $M.W = 480,000$ ， $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\beta'$  和  $\sigma$  的  $M.W$  各为 36,500、150,000、160,000、86,000 道尔顿。该酶除去  $\sigma$  亚基后成为  $\alpha_2\beta\beta'$ ，称为核心酶（core enzyme）， $\sigma$  亚基又称  $\sigma$  因子，它和核心酶都是酶的功能单位。其它细菌的 RNA 聚合酶与此相似，但分子量稍有不同。RNA 聚合酶合成 RNA 的步骤如下。

#### （一）RNA 合成的起始

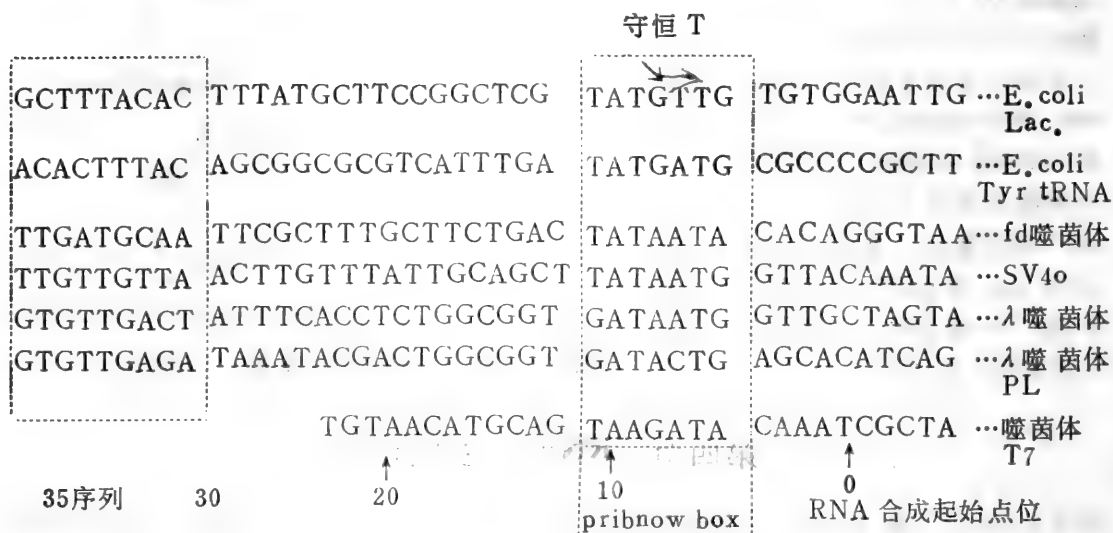
转录 RNA 的第一步是 RNA 聚合酶识别 DNA 上一个专一性序列并与之结合。酶与该 DNA 部位结合的紧密程度比与其它部位的结合要高一个数量级以上。Pribnow 曾设想过一个理想的启动子由 20 个核苷酸构成，并假设 RNA 聚合酶可以通过与天然 DNA 螺旋的专一性接触识别启动子； $\sigma$  因子和核心酶各结合于 DNA 上的  $R_{-}$  和  $R_{+}$  区。RNA 聚合酶似乎可与不同启动子接触，这些启动子在空间有惊人的类似性。*E. coli* RNA 聚合酶的理想启动子

序列如下式。

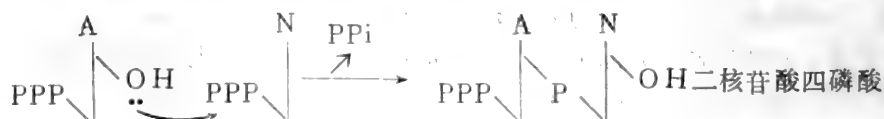
 $R\sigma\bar{x}$ 

Rc区 RNA合成的起始点

后来发现各种基因的 pribnow box 的序列及其附近序列如以下各式。

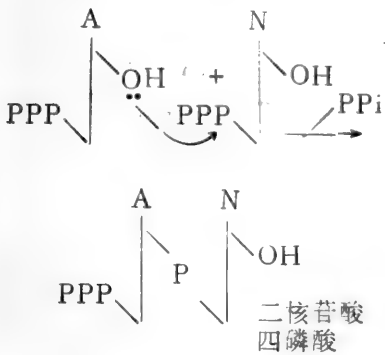


先由 RNA 聚合酶  $\sigma$  亚基识别 DNA 专一性序列（称为 35 序列），典型的 35 序列含九个碱基对，然后整个酶与模板结合，对模板起保护作用。核心酶就结合在 pribnow box 处。一旦核心酶与 pribnow box 结合，前面  $\sigma$ -亚基结合的部位就被解离。pribnow box 为 TATAATC 七个碱基，因基因不同可有所改变。其中第六个位于起始转录碱基的左边约 6—9 个碱基（各基因不同）处，不管什么启动子都一样，因它是一个 T，故称为“守恒 T”（conser-



evd T)。Pribnow box 的作用目前认为是定位 RNA 聚合酶,使之从左向右合成 RNA。一旦 RNA 聚合酶在那里结合,DNA 的双链立即打开,形成打开的启动子复合物。这个复合物高度稳定,在链起始中是一个活性中间物,在这个复合物中,DNA 螺旋双链局部解链,其解链的位置约从离 pribnow box 左端10个碱基处开始,直至转录起始位点为止。RNA 合成的启动是通过核心酶、第一和第二底物核苷酸(一个二核苷酸四磷酸,它与转录起始

点上的核苷酸互补。RNA聚合酶实际上只用ATP或GTP启动转录，因此RNA聚合酶结合的起始部位应是dTMP或dCMP，大多数为dTMP。



RNA聚合酶与启动子结合并启动RNA的合成情况如图13—30所示。

RNA链的延伸

RNA新链的合成是从二核苷四磷酸的3'—OH连续从NTP加入NMP而生成，生成方式如图13—31。

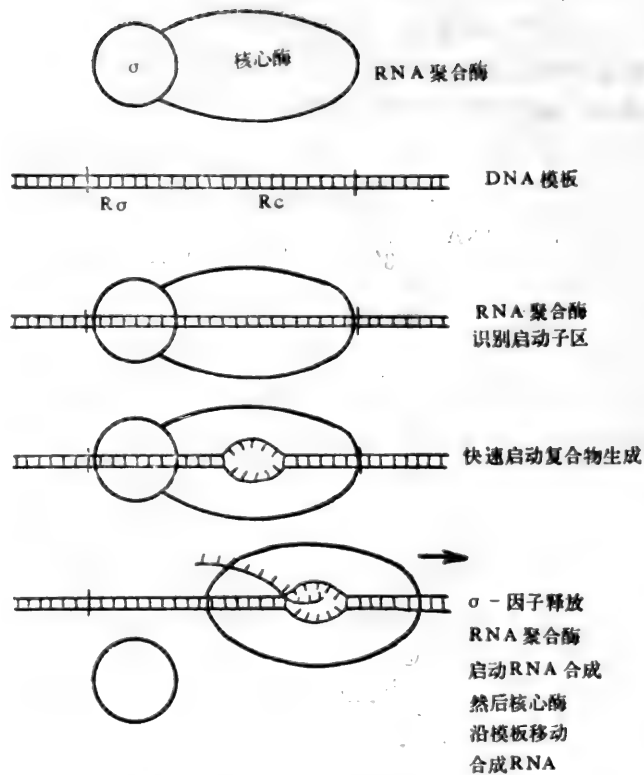


图 13—30 RNA合成的起始图

从图13—31可以看出，所合成的RNA的5'—一端第一个核苷酸带5'—三磷酸，而生长链的末端为3'—OH，这可从RNA的碱水解产物  $PPP\text{G}_P + \text{A}_P + \text{U}_P + \text{C}_P + \text{N}$  得到证实。所以RNA的合成也是从5'→3'方向进行。是生长链的3'—OH逐个亲核攻击NTP的α—磷原子而形成的磷酸二酯键。所参入的各核苷酸的次序决定于模板股的核苷酸序列。但对进入核苷酸的选择或许首先决定于它是否能与酶分子和模板碱基所结合的一个部位相配。而不是只靠模板的指令。

许多抗菌素能抑制RNA的合成，但抑制机制不一定相同。利福平 (Rifampicin) 和曲张霉素 (Streptovaricin) 结合于RNA聚合酶的β—亚基上，可阻断RNA合成的起始；利福霉素 (Rifamycin) 也结合于RNA聚合酶的β—亚基上，但它抑制RNA链的延伸，放线菌素D也阻止RNA链的延伸，但它不与酶结合，而是与DNA模板上的dGMP结合形成复合物，从而阻止RNA聚合酶的核心酶沿DNA模板移动。

随着RNA的合成，模板DNA逐渐重新形成双链，而合成的RNA则离开模板。胰RNase的切割试验表明：RNA上约有10个碱基可与DNA结合，以抵抗酶的作用（该酶能催化单链RNA水解，但不能催化DNA—RNA杂交体水解）。RNA的转录速度不是从头到尾都一样，而是在约富含G:C对3—10个碱基处有暂停现象，原因尚未充分弄清。

### (三)RNA 链的终止和新 RNA 链的释放

在 DNA 模板上一专一性序列作用于核心酶时，转录才终止。终止包括三个方面，即：停止 RNA 延伸；释放新合成的 RNA；从模板上释放 RNA 聚合酶。迄今已测定了20个终止序列。每个都有下式所示特性。

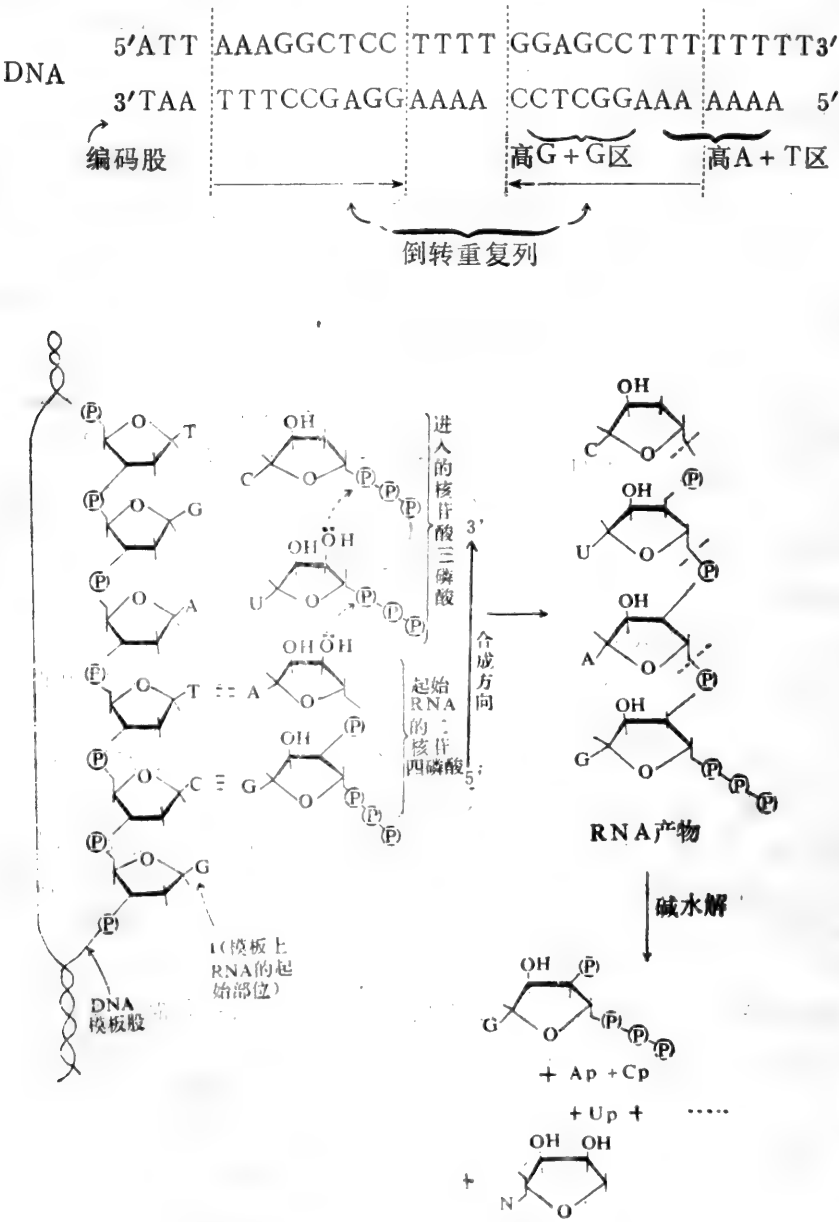


图 13-31 RNA合成时链的延伸方式

E.coli 的 RNA 聚合酶的所有强终止子具有三个共同的结构特点。

```

      . U . U .
      U       U
      .       .
      C   G
      C   G
      U   A
      C   G
      G   C
      G   C
      A   U
      A   U
      A   V

```

图13—32 RNA 转录的终端发夹结构

①模板DNA上有一系列高AT碱基对区，它以高GC区为前导，并且这些高GC与高AT区在DNA上形成对称的倒转重复，而中间则用一段不重复的序列间隔着。终止就发生在一段富AT的区域。这可能是因为减少了核心酶和强终止子上核苷酸序列间所建立起来的许多接触。

②终止子上存在反向重复序列，使转录生成的RNA终端形成发夹结构（图13—32）。这个结构可匹配到核心酶—DNA复合物上一适当位置，也可能它本身通过一专一性相互作用结合到核心酶上，并且从DNA模板合成互补的3'一端寡聚U，使DNA—RNA杂交体只靠少数不稳定的rU·dA碱基对来维持，这样就使RNA核心酶和结合得很弱的3'一端短链都离开DNA，转录就此告终（如图13—33）。终端发夹结构如图13—32所示。

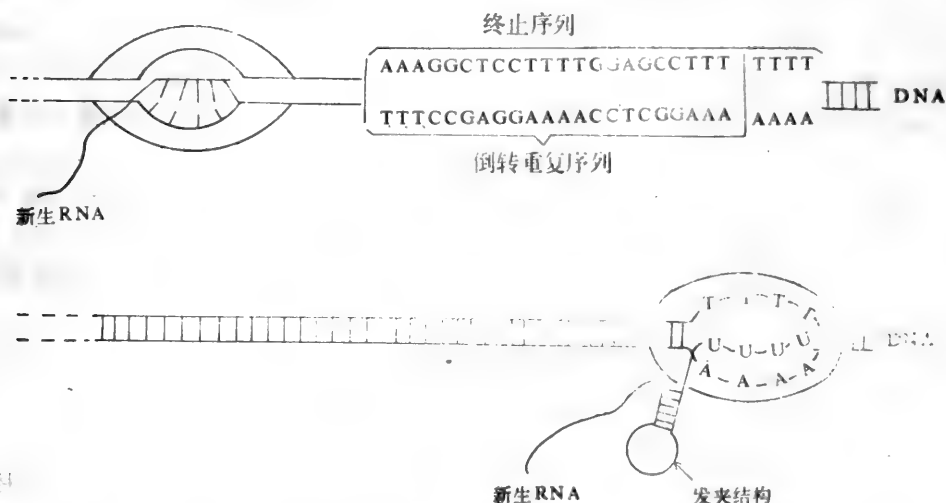


图13—33 RNA的终止序列及末端终止作用图

③一个强终止子构成一个空间的碱基对，使RNA聚合酶从DNA上释放。而弱终止子则不含这关键性碱基对，而含有一ρ-因子（rho因子）。ρ-因子是一个寡聚蛋白，单体M.W=5,000，它也显示ATP酶活性。在需ρ因子的终止作用中，ρ-因子与新RNA和附着在终止因子上的RNA聚合酶核心酶相互作用，使RNA产生发夹结构，成为主要的制动装置，并利用ATP水解释放的能量，使ρ-因子推开终止子上的核心酶，同时从复合物上除去新生RNA。这种终止作用是可调节的。抗终止蛋白如λ-噬菌体的N-基因产物，可阻断ρ-因子的终止作用。RNA的终止序列以及末端终止作用如图13—33所示。

## 二、依赖于DNA的真核RNA聚合酶

到目前为止，已检出真核细胞RNA聚合酶大致有三类。按其从0.1—0.37M盐浓度梯

度洗脱次序分别称为 RNA 聚合酶 I、II、III。每种至少可分辨出两种形式,例如 I<sub>A</sub>和 I<sub>B</sub>。

已经确定 RNA 聚合酶 I 来源于核仁中,而另两种在核质中。初步确定 RNA 聚合酶 I 的产物为 tRNA; II 的产物为 mRNA; III 的产物为 tRNA 和 5S RNA。

此外还有一些少量的 RNA 聚合酶存在于线粒体和叶绿体中,对它们尚未作详细研究。

核仁酶适宜在低离子强度下作用,需要  $Mg^{++}$ ,它不受  $\alpha$ -鹅膏蕈碱(一种蕈毒素,为八肽化合物)抑制。核质酶在高离子强度和  $Mn^{++}$  存在下活性最高。其中 II 类酶可被低浓度(低到  $3 \times 10^{-8} M$ )  $\alpha$ -鹅膏蕈碱抑制;而 III 类酶则需在高浓度( $10^{-4} M$ )  $\alpha$ -鹅膏蕈碱下才被抑制。

$\alpha$ -鹅膏蕈碱对真核 RNA 聚合酶 II、III 的抑制象利福平对原核 RNA 聚合酶的抑制一样,是专一的,它似乎是结合到 RNA 聚合酶上而不是结合于模板 DNA 上。但毒蕈素是抑制 RNA 的延伸,所以它又象利链霉素。

真核细胞 RNA 聚合酶是一个大分子多亚基酶,  $M.W = 500,000$  道尔顿,有两个大亚基( $M.W$  超过了 100,000 道尔顿)和许多小亚基( $M.W$  小于 100,000 道尔顿)。I、II、III 类酶的大小亚基不同,但在不同动物中几乎是恒定的。

从真核中没有获得  $\sigma$  和  $p$  因子的类似蛋白因子,但已间接证明 mRNA 基因的起始转录除需要 RNA 聚合酶 II 外,还需要另一种可溶性因子。另外,还发现把爪蟾(*xenopus borealis*)的 5S RNA 基因和  $^{32}P$  标记的 5'-NTP 注射到爪蟾的卵母细胞核中,则爪蟾的内源 RNA 聚合酶 III 能识别所注入的 *xenopus borealis* 的 5S RNA 基因的起始和终止信号。它也能识别面包酵母的 tRNA 基因的起始和终止信号。如果把猴病毒 SV40 DNA 和  $^{32}P$ -NTP 注入到爪蟾中,则其 RNA 聚合酶 II 可识别 SV40 DNA 上的一个专一的病毒蛋白的 mRNA 基因的起始和终止信号。这些实验都间接地证明了真核细胞的 RNA 聚合酶需要准确地对基因的起始和终止信号进行识别。

## 第五节 RNA 的转录及转录后加工

真核细胞的 RNA 大部分存在于细胞质中,核仁中也有一些 RNA(约 5%)。核 RNA 的存在是瞬时的,是形成细胞质 tRNA、rRNA、mRNA 途径中的中间物,这些中间物的一级结构在某些场合被细胞酶所修饰,然后转录物才从模板 DNA 上完成并脱落。

修饰包括以下步骤:一是修整与裁剪,即采用一种切割机制,以改变转录物的长度;二是除去序列中的拼接物,再连接起来,以减少链的长度;三是对碱基或糖残基进行修饰;四是加上特殊序列。通过以上四个步骤即可形成各种 RNA,这一过程称为 RNA 转录后的后加工过程。

### 一、tRNA 的转录及其后加工

杂交技术证明 *E. coli* 约有 60 个特殊基因与 tRNA 互补。真核生物则更多,酵母约有 320~400 个;果蝇有 750 个;爪蟾有 8000 个。这说明 DNA 上的 tRNA 基因是以多拷贝存在的。

根据对 *E. coli* tRNA<sup>val</sup> 的研究,发现 tRNA 的转录起始于启动子部位,这个启动子

位于与成熟 tRNA 互补的 DNA 区向 RNA 5'-端数第 11 个核苷酸处，而终止子位于与 RNA 3'-端 C—C—A 互补的 DNA 区向 RNA 3'-端数第 224—226 个核苷酸处。成熟 tRNA 为 85 个核苷酸，故其初转录物为  $41 + 85 + 224 = 350$  个核苷酸。一般在 DNA 上常有两个 tRNA<sup>yr</sup> 拷贝一起转录，但两个拷贝间还有约 200 个核苷酸的间隔物在转录时也与两个 tRNA<sup>yr</sup> 一起被转录。这个 tRNA 的转录需要  $\rho$ -因子终止。这大的转录物要转变为成熟的 tRNA 需要一系列步骤来完成。首先要切去间隔区(图 13—34)，然后按下列步骤来完成。

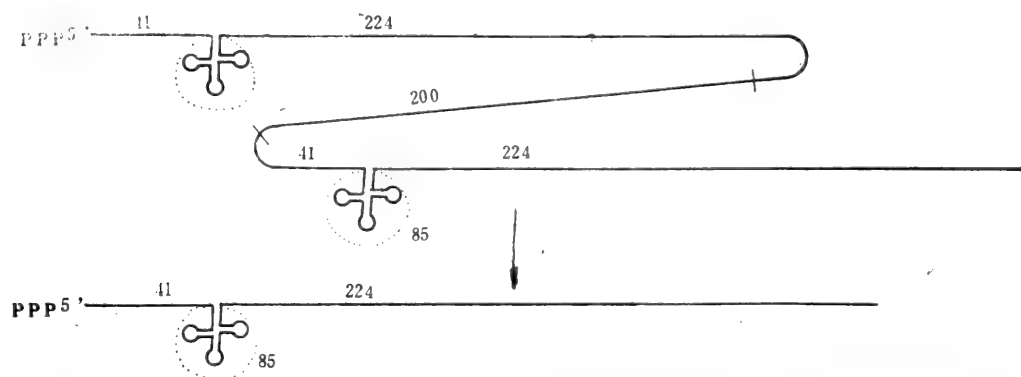


图 13—34 *E. coli* tRNA<sup>yr</sup> 两个相邻 tRNA 的前转录物转变为单个前转录物的示意图

### (一) 3'-OH 端的形成

这一过程需要一个内切核酸酶识别初转录物上的一个发夹结构(图 13—35 中的 I)，以及一个识别 C—C—A 三核苷酸序列的外切核酸酶。内切核酸酶在图 13—35 中的①位上切割后，外切核酸酶 D 即连续切去 7 个核苷酸(图 13—35②)，这时离 3'-CCA—OH 仅剩两个核苷酸，待 5'-端加好工后，再切去这两个核苷酸。这 3'-端还剩两个核苷酸的 RNA 整体称为前 tRNA。整体结构为：5'P-41 核苷酸-tRNA-2 个核苷酸。

### (二) 5'-端的形成

5'-端是由一个核酸内切酶 RNase P (见第六章末)切割而形成(3)。该酶是使所有 *E. Coli* tRNA 5'-端形成的酶。RNase P 可把 tRNA 前体切成 tRNA 和一个单链 RNA 碎片(这个碎片后来被外切酶切掉成为可重新利用的核苷酸)。RNase P 似乎对切割处的序列并无专一性识别，而只是识别带一些发夹结构的 tRNA 分子并在其正确位置上切割。一旦 5'-端切割完成，RNase D 即继续切去 3'端剩余的两个核苷酸而成为成熟的 tRNA，如图 13—35④。

(三) tRNA<sup>yr</sup> 上有两个 U 转变为假尿苷( $\psi$ )，两个 U 转变为 4-硫尿苷(4tU)，一个 G 修饰成 2-O—甲基鸟苷(2mG)和一个 A 修饰成 2-异丙基腺苷(2ipA)(见图 13—35⑤)。

除了上述 tRNA<sup>yr</sup> 一个转录前体有两个 tRNA 外，有的 tRNA 前转录体有四个 tRNA，如 tRNA<sup>Leu</sup>。有些前转录体只有一个 tRNA，如 tRNA<sup>Ser</sup> 和 tRNA<sup>Tr</sup>。而有些 tRNA 则与 rRNA 一起被转录出来。目前，人们一般认为将 tRNA 多重前体切成单个 tRNA 前体的酶是核酸内切酶 RNase O。

真核细胞中，tRNA 基因以较分散形式排列，有些分散在整个基因组中，有些以明显的

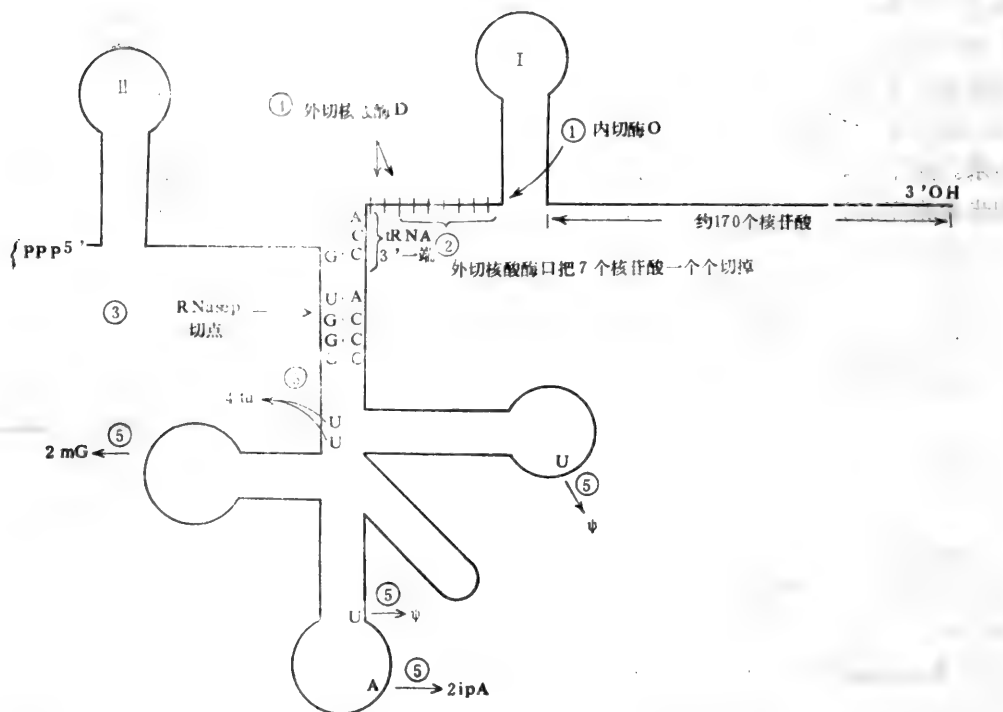


图13-35 *E. coli* tRNA<sup>Tyr</sup> 前体转变为成熟 tRNA<sup>Tyr</sup> 的切割和修饰过程及所需的酶

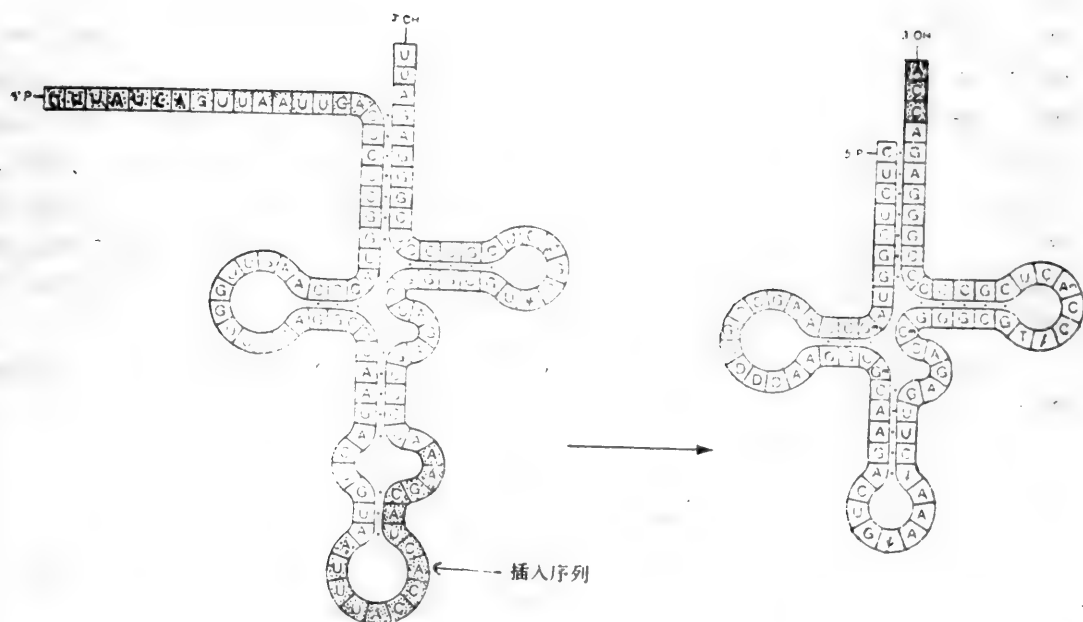
规则状态集聚于一单一的染色体区。它可能是不同的 tRNA 基因，也可能是多拷贝的相同 tRNA 基因。在酵母 tRNA<sup>Tyr</sup> 基因的研究中发现其编码序列中有14个核苷酸的插入序列，恰好跟在反密码子的3'-端。tRNA<sup>Phe</sup> 基因则含18个核苷酸的插入序列。tRNA<sup>Tyr</sup> 前体及其转录后加工过程示如图13-36。

每个 tRNA 编码区的 3'-端 DNA 上是一个腺苷酸富集区，这一点与 *E. Coli* 转录终止信号类似，可能也是起转录终止作用。

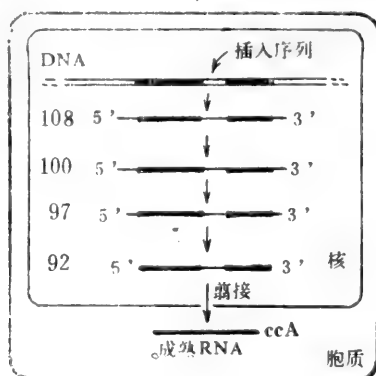
tRNA 的 3'-端都有一个 C—C—A 序列，这不象 *E. Coli* tRNA，它不是前体切割后留下的，而是先转录成一个 3'-端带有易除去核苷酸的前体。除去那些核苷酸后，得一受体分子，其 3'-端有 3'-OH。此后这 3'-OH 接受两个 CMP，然后再接受一个 AMP，而完成带 C—C—A 3'-端的 tRNA。在细胞中，这个 C—C—A 序列似乎有一代谢循环。显然能连续除去或代上。

真核细胞中 tRNA 的后加工也包含核苷酸的修饰过程。反密码子 5'-端第一位核苷酸常可修饰成尿苷-5-氧乙酸、5-甲基氨基甲基-2-硫代尿苷、肌苷。这第一个核苷酸能在密码子的摆动部位识别 A、G 或 U，肌苷则能识别 C、U 或 A。位于反密码子 3'-OH 端下一个核苷酸，常被修饰成 6-（异戊-2-烯基）腺苷、2-甲基硫代-6-（异戊-2-烯基）腺苷、6-甲基腺苷、2-甲基腺苷、1-甲基鸟苷等，这样，修饰碱基与反密码子相邻，可通过稳定反密码环的三维结构，使密码子与反密码子易于匹配结合。位于 tRNA 分子中其它任何地方的核苷酸的修饰，例如 7-甲基鸟苷和 5-甲基胞苷常发生在三叶草结构的单链区，可能是通过阻止错误碱





(a) 为带19个核苷酸的5'前导序列, 及带14个核苷酸插入序列的 tRNA<sup>Tyr</sup> 前体的后加工结果。



(b) 后加工过程示意图。括号中数字为各中间物的核苷酸数目。

图13-36 酵母 tRNA<sup>Tyr</sup> 前体加工为成熟 tRNA<sup>Tyr</sup> 的过程

基的配对来稳定三维结构。

tRNA 中存在或不存在前导序列对调整以上修饰作用具有影响。

## 二、rRNA 的转录及其后加工

### (一) 原核细胞中 rRNA 的转录及其后加工

在原核细胞中研究得较多的是 E. Coli rRNA, 其 DNA 上至少有七个 rRNA 转录单位, 分散于基因组中。每个转录单位常包含着编码16S rRNA、23S rRNA、5S rRNA 和一个或多个 tRNA 的序列。其排列次序为: 16S rRNA-tRNA<sup>Ile</sup>-tRNA<sup>Ala</sup>-23S rRNA-5S rRNA

RNA-tRNA<sup>Val</sup>-tRNA<sup>Trp</sup>-终止子。这些基因常作为整体而被转录成一个30S初转录物。这个初转录物在缺RNase III内切酶的E·Coli突变体中有累积。用RNase III处理此30S初转录物,得一些中间前体P16S III、P23S III、P5S III和tRNA,前三者是16S、23S和5S rRNA的前体。在核糖体S<sub>4</sub>蛋白协助和RNA酶M<sub>16</sub>的作用下,P16S III产生正常16SrRNA的5'-端。另外还有一种核酸酶催化产生16S rRNA的正常3'-端。在P23S III形成23S rRNA过程中,似乎包含同样形式的酶。P5S III在RNaseE的作用下,除去3'-端多余序列。在一个外切酶作用下,再除去三个5'-端多余序列,即生成5S rRNA。在枯草杆菌中其5S前体5'-端有21个核苷酸,3'-端有42个核苷酸,只要RNase M<sub>5</sub>存在,两端多余的序列即可除去而生成5S rRNA,所以这个酶主要是识别5S rRNA的三级结构。

在E·Coli中,一个rDNA转录单位的基因排列以及rRNA的转录和后加工过程如图13-37所示。

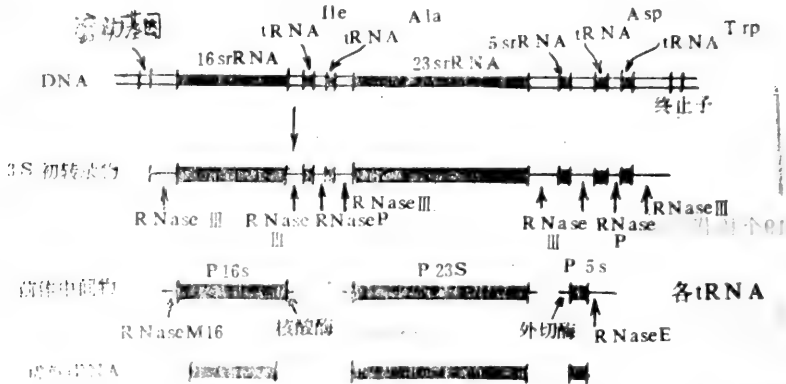


图13-37 E·coli rDNA 转录单位中各基因的排列、转录、后加工以及各酶切割点示意图

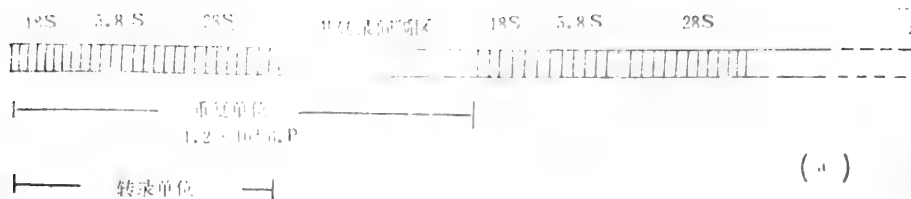
有些E·Coli rDNA转录单位的启动子已列序,如在rrnD和rrnX中有两个启动子,二者相距110个核苷酸。在rrnD中rRNA的合成由GTP起始,起始位置在离16S基因284个核苷酸处。在rrnX中则由ATP起始,起始位置在离16S基因285个核苷酸处。在P<sub>2</sub>启动子中rRNA的合成是特殊的,由CTP起始,位于离16S基因176个核苷酸处。各E·Coli品种的转录终止作用相似。

## (二)真核细胞 rRNA 的合成和转录后加工

真核细胞的核糖体含有四种rRNA,按其沉降常数分为5S、5.8S、18S和28S等rRNA分子,这些rRNA基因的编排不同于原核细胞。

在典型的动物细胞核仁中,有几百个拷贝的DNA序列(rDNA)编码18S、5.8S和28<sup>S</sup>rRNA。它们依次序如图13-38(a)。每个拷贝之间有非转录间隔区。在爪蟾中有一常染色体的核仁组织者区,是转录此rRNA初转录物(40S)的区域,每个转录重复单位长度相等,核苷酸序列也完全相同。每个重复单位的非转录间隔区长度在2.7kb—9kb间变化。但其序列则有许多共同之处,非洲爪蟾的rRNA基因的排列及转录物的形成等过程如图13-38(b)所示。初转录物的后加工靠一些类似于原核细胞RNase III的内切酶。

5S rRNA基因位于核仁外,由相互分开的120个核苷酸单位的转录区构成。每个转录区之间有一个约600个核苷酸的非转录区,5S rRNA的拷贝数很多,有好几千个,在卵子发生期甚



(a)



(b)

图13-38 (a)爪蟾 rDNA 的排列(b)爪蟾 rRNA 的转录

至可达24,000个。在卵成熟期40S单位可增加至 $2 \times 10^6$ 个拷贝，它占总细胞DNA的75%。

酵母中 rRNA 基因排列为17S、5.8S、26S。但5S基因也连在大 rRNA 基因附近作为一个重复单位。但这个重复单位的转录是分开进行的，一个转录大的37S初转录物，由RNA聚合酶 I 转录 DNA 的一股而形成；另一个则由 RNA 聚合酶 II 转录对应股而生成。

在四膜虫(tetrahymena)中编码 rRNA 的大核基因也是多拷贝的，每个 rDNA 分子是倒转重复结构。一个初生的 rRNA 前体含两个顺反子，对称地排列在中心轴两侧(图13-39)。

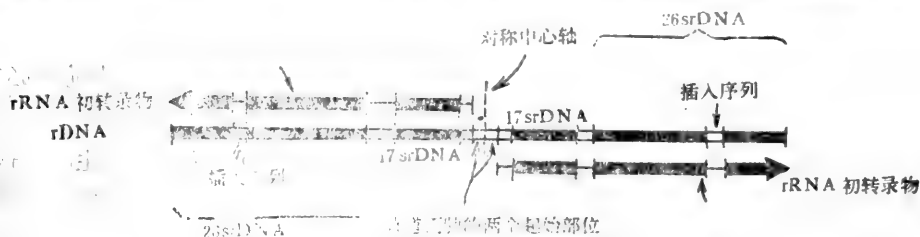


图13-39 四膜虫中的 rDNA 及其初转录物

在人的 Hela 细胞中，45S ( $4.1 \times 10^6$  道尔顿) 初转录物在核仁中出现。用同位素标记

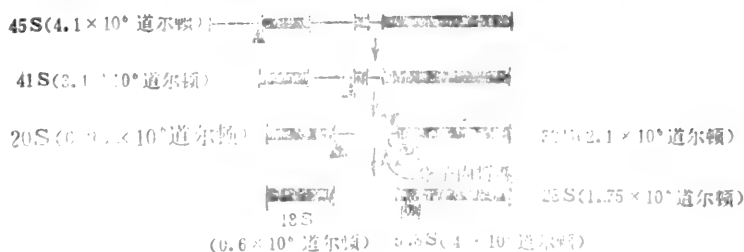


图13-40 Hela 细胞 rRNA 前体的切割过程

注：▲表示切割部位

证明45S 初转录物在较长时间后可成为41S 和32S rRNA 前体，随后又形成20S 前体，再形成18SrRNA。28S 最后形成，它先在核仁中，然后在核质中，最后出现在细胞质 中。5.8S rRNA 是在32S→28S过渡时形成的。

Hela 细胞中 rRNA 前体以及它们在核仁中的切割示如图13—40。

真核细胞的5S rRNA 基因的分布在不同生物品种中略有不同。下面是一些 真 核细胞 5S rRNA 的重复单位的排列情况（图13—41）。

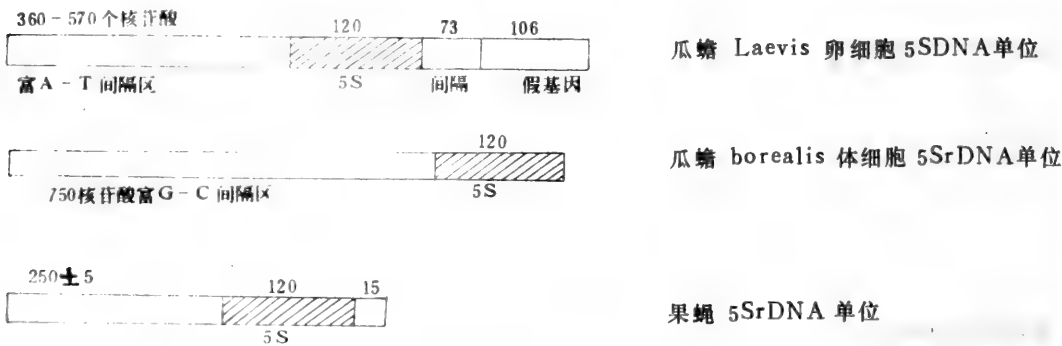


图13—41 几种真核 rDNA 重复序列中的一个 rDNA单位

据迄今研究的结果来看，高等真核细胞的5S rRNA 似乎是从基因直接转录而成的，没有什么后加工过程。

### 三、mRNA 的合成和后加工

#### (一)原核细胞 mRNA 的合成

E • Coli mRNA 的转录的启动及终止序列已在前面介绍过。转录形成的大前体必须 经过后加工才能成为成熟 mRNA。用 T<sub>7</sub> 噬菌体感染的E • Coli在早期可检测到这个大mRNA 前体，它是由按序排列在 T<sub>7</sub> 噬菌体基因5'-端的五个顺反子(cistron)转录而产生的。这个大转录物经 RNase III 等酶迅速切割加工， 得到五个分离的单顺反子 mRNA（如图13—42）。

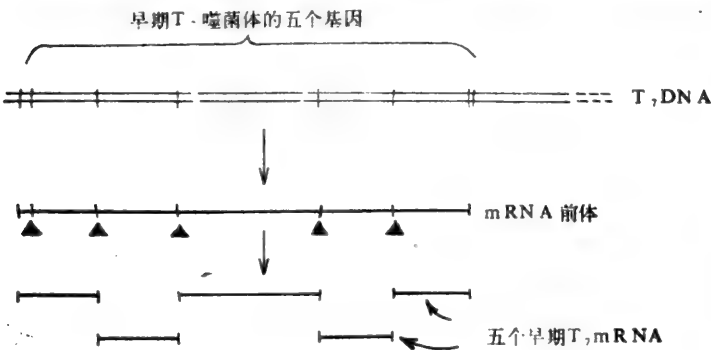


图13—42 T<sub>7</sub> 噬菌体早期 mRNA 的转录和后加工

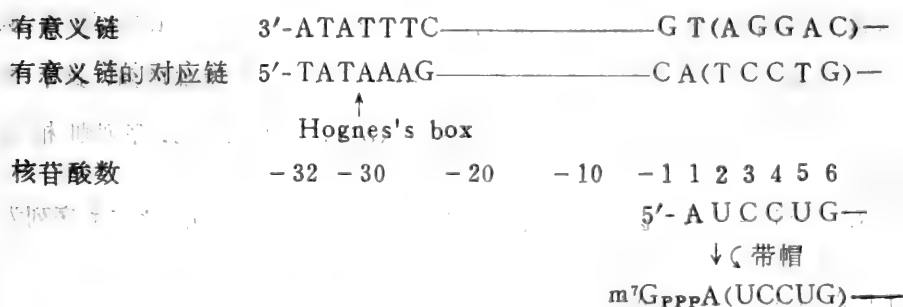
有两个内含子，但比 β-球蛋白的内含子短得多。

鼠的 β<sup>M</sup> 球蛋白基因最初是在红细胞中转录成--15S mRNA 前体，它有5'-端帽子 和

(二)真核 mRNA 的合成  
兔和鼠球蛋白基因不是连续地存在于 DNA 链上，而存在于 DNA 上的三个 编 码 区 段，称为外显子。这三个区段被大小两个插入序列所隔开，这插入序列称为内含子。各种鼠和兔的大小内含子长度几乎相等，其位置也差不多，大的为646和580bp， 小的为115和126bp。鼠的 α-球蛋白基因也

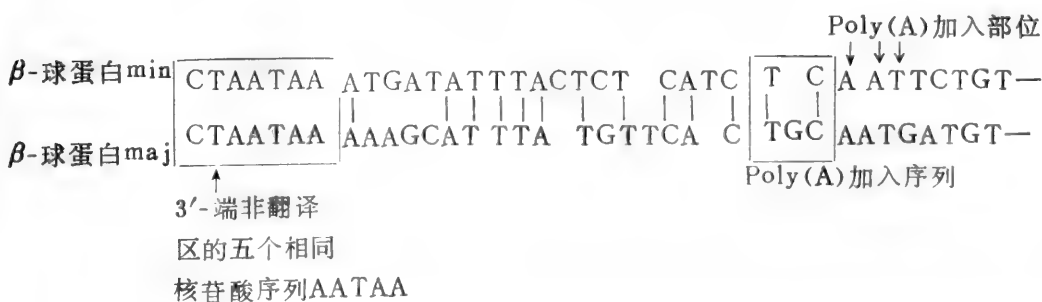
3'-端多聚A(是转录后加工带上的), 并有插入序列的互补序列。20分钟加工成成熟mRNA, 其5'-端没有被缩短, 但这并不意味着这5'-端就是转录的起始点。

两种鼠  $\beta$ -球蛋白基因由帽子区向 5'-侧逆行。一个具有 7 个核苷酸的序列—TATAA<sub>G</sub><sup>A</sup>, 约距帽子区 30 个 b、p、( 3 圈螺旋 )。这样使 TATAA 和帽子部位都各集中在 DNA 螺旋的大槽中, 且在螺旋的同一面, 这样就使 RNA 聚合酶易于与之作用而定位。 $\alpha$ -球蛋白也有同样的六核苷酸序列。更有趣的是这 7 核苷酸序列 TATAA<sub>G</sub><sup>A</sup> 与 E·Coli 中 pribnow box 的头五个核苷酸 TATAA 序列是相同的, 而这正好是 E·Coli 中 RNA 聚合酶的识别部位 (RC)。它位于原核细胞 RNA 起始部位前 5—6 个核苷酸。所以这 7 个核苷酸序列区可能代表真核细胞 mRNA 转录时 RNA 聚合酶的一个识别部位。因这一点是 Hogres 提出的, 故常称为 Hogres's box。下式表示 RNA 聚合酶 I 结合于 TATAAAG Hogres's box 互补链上进行转录的情况。



从上式可知 RNA 聚合酶 I 结合于 TATAAAG 的互补链上, 并对该互补链进行转录, 转录起始于该有意义链的3'-端向下行第32个核苷酸 T 处, 其两侧富含嘌呤核苷酸。转录后立即戴帽。

$\beta$ -球蛋白3'-端有一强调节区(如下式),这一调节区有一五核苷酸序列 AATAA,离 poly(A)加入序列约18个核苷酸。



而15S mRNA 前体中插入序列的后加工则要经过两个或更多个切割和连接反应(剪接反应), 这在下节再作详细介绍。关于鼠 $\beta$ -球蛋白基因及其转录和后加工示如图13-43。

经分子克隆和核苷酸序列分析得出卵清蛋白基因有七个插入序列。每个转录单位的最小

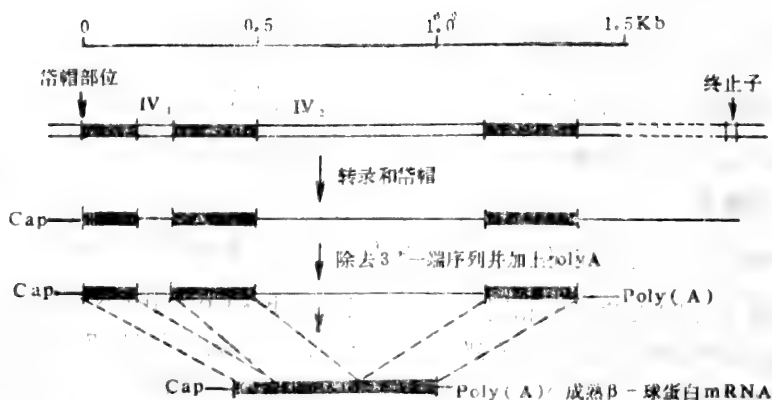


图13—43 鼠  $\beta$ -球蛋白基因的转录和后加工成 mRNA ( $IV_1$  和  $IV_2$  为两个插入序列)

长度为7.8kb。从编码mRNA 5'-端的部位(即假定的帽子部位)逆行30个bp, 有一 TATATAT 序列, 相当于  $\beta$ -球蛋白中相同的富 AT 序列。逆行70个 bp 也有与  $\beta$ -球蛋白相同的序列。从而提出: 真核细胞 RNA 聚合酶的识别部位是 DNA 中的  $GG^G_T CAATCT$  特殊序列, 这个序列类似于原核 E·Coli RNA 聚合酶  $\sigma$ -因子的识别部位 ( $R\sigma$ ), 而TATATA 序列则相当于核心酶的识别序列。

卵清蛋白 mRNA 基因3'-端转录区, 似乎终止于下式所示序列。方框中的核苷酸序列为



小鸡卵清蛋白基因的 3'-端非翻译区特殊的五核苷酸序列。可能的 Poly(A)加入部位如箭头所示。

卵清蛋白基因的排列及其转录前体 mRNA 和后加工成 mRNA 的过程示如图13—44。

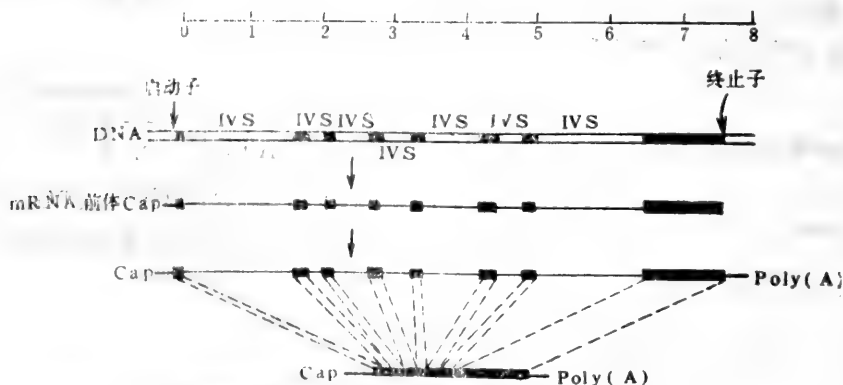


图13—44 卵清蛋白基因, 它的转录前体加工和成熟 RNA 的生成

除上述两例外, 其它如卵粘蛋白、伴清蛋白、昆虫的纤维蛋白等都有相似的 7 核苷酸序列, 位于其起始转录部位前约30个 bp 处。伴清蛋白基因中离帽子部位前84个核苷酸处也有一

真核 RNA 聚合酶识别序列 GGACAAACA。

(三)真核细胞 mRNA 前体的剪接和成熟

1. mRNA 前体的剪接

通过对 mRNA 编码基因和插入序列间接头的研究, Chambon 提出:所有这些接头在序列上是相近的,且插入序列的 5' 和 3'-端大多以二核苷酸 GU 和 AG 分界,即 AG↓GU...AG↓GU (例见表13—4)。这很象是拼接专一性信号。但剪接机制是很复杂的,它可能还包含一些核和胞质因子在起作用。近来有人用专一性抗体进行检测,结果得六种复合物,每种都是由不同的小的核 RNA (SnRNA) 和七种相同的蛋白质构成。这些复合物似乎旋即与核糖核蛋白颗粒结合,正象 mRNA 一旦形成就立即与核中核蛋白颗粒结合一样。

曾有人研究过其中一个存在最丰富的 SnRNA—UI RNA,发现其 5'-端序列与拼接头存在的序列互补,现示如图13—45。

表13—4 mRNA前体剪接接头两侧的一些序列

| .....外显子             | 内 含 子       | 外显子...            |           |
|----------------------|-------------|-------------------|-----------|
| 卵清蛋白                 | ...AAAUAAAG | GUGAGCC...AUUACAG | GUUGUU... |
|                      | ...AGCUCAG  | GUACAGA...UAUUCAG | UGUGGC... |
|                      | ...CCUGCCA  | GUAAGUU...UUUACAG | GAAUAC... |
|                      | ...AGAAAUG  | GUAAGGU...CUUAAAG | GAAUUA... |
|                      | ...GACUGAG  | GUAUAUG...GCUCCAG | GAAGAA... |
|                      | ...UGAGCAG  | GUAUGGC...CUUGCAG | CUUGAC... |
| 鼠β <sup>m</sup> -球蛋白 | ...UGGGCAG  | GUUGGUA...UUUUUAG | GCUGCU... |
|                      | ...CUUCAGG  | GUGACUC...CCCACAG | CUCCUG... |
| 兔β-球蛋白               | ...UGGGCAG  | GUUGGUA...UUCUCAG | GCUGCU... |
|                      | ...CUUCAGG  | GCGAGUU...CCUACAG | UCUCCU... |
| SV <sub>40</sub> (T) | ...AAGUGAG  | GUAUUUG...AUUUUAG | AUUCCA... |
| SV <sub>40</sub> (t) | ...CUAUAAG  | GUAAAUG...AUUUUAG | AUUCCA... |

在真核细胞中有一种核酸酶,其中含有 RNA 分子为其专一性作用所必需。且 UI RNA 分子和真核细胞中专一性蛋白质相联系,它可能是和专一性核酸酶和连接酶一起作用,为它们进行特殊剪接过程提供必需的识别功能。同时这个小 RNA 由于与拼接处序列互补,而把初转录物的外显子两个接头端点带到一起,以便拼接。但这些只是假设,尚需进一步确证。

hnRNA 比成熟的 mRNA 要大得多,但 hnRNA 不经剪接除去内含子是不能进行表达的。其原因虽尚未弄清,但许多实例证明了这一点。例如早期未分化的胚细胞——培养的胚

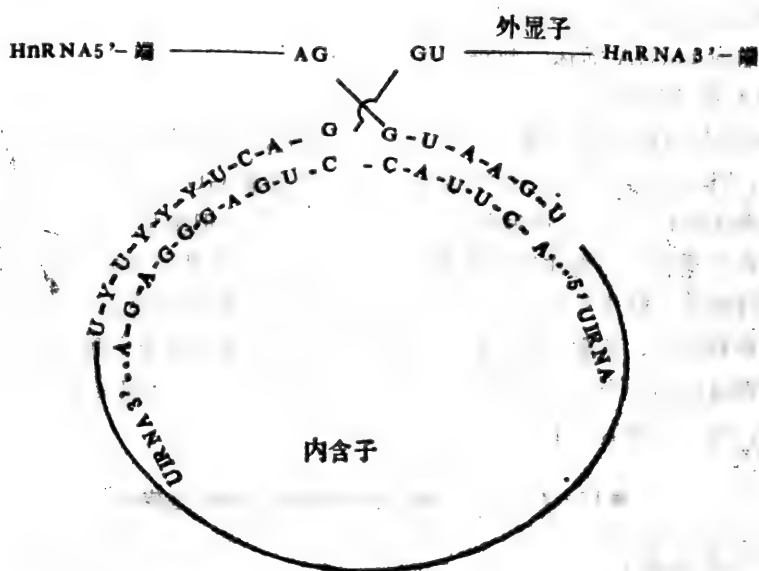


图13-45 一个 SnRNA-UI RNA 与 mRNA 前体 hnRNA  
外显子和内含子间接头处附近序列的互补作用

癌细胞，其核机构似乎不能从 SV<sub>40</sub> 病毒 DNA 初转录物除去内含子。因此在 SV<sub>40</sub> 基因组上的基因，在非分化的胚胎细胞中是不会表达的。只有细胞在体外分化后，能从 SV<sub>40</sub> 初转录物中除去内含子，SV<sub>40</sub> 基因才能表达。又例如地中海贫血病患者，其血红蛋白  $\beta$ -珠蛋白基因严重呈现表达不足。其原因似乎是由于其外显子和内含子接头处有一核苷酸发生改变，阻碍内含子的切除，因而导致该蛋白  $\beta$ -链的合成（表达）减少或缺乏。所以 hnRNA 的剪接也可能是调节基因表达的一种重要步骤。

这样大的内含子经转录又切去，对一个细胞来说似乎是一种浪费。内含子是否有什么重要作用，目前尚不清楚。不过已经知道，不含内含子的基因是不能编码珠蛋白的，一个或更多个内含子，似乎含有基因表达所需的信息。也有人认为：它在形成稳定的 mRNA 中，可能起某种作用。

## 2. 真核 mRNA 5'-帽子的形成和作用

大部分核 mRNA 前体是带帽子的。现在已经弄明白这帽子是怎样戴上去的，即由核苷酸磷酸酶首先把初转录物 5'-端的三磷酸除去一个，成为二磷酸，然后从 GTP 转移 GMP 于其 5'-端二磷酸上，然后在 RNA (-鸟嘌呤-7-) 甲基转移酶催化下，从 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 转一个甲基于刚加上的 GMP 的 7-位上，成为戴 0-型帽子的 mRNA 前体。如果在 RNA(核苷-2-O)甲基转移酶催化下，再从 SAM 转一个甲基至第二个核苷酸的 2'-OH 上，则形成 1-型帽子。如果再转移一个甲基到第三个核苷酸的 2'-OH，则形成 2-型帽子。各种帽子结构见下式。帽形成的反应示如图13-46。

戴帽作用发生在起始合成 mRNA 后的很短时间内，可能在 RNA 聚合酶 II 离开起始部位之前就戴上。戴帽过程中所需的酶已从 Hela 细胞中纯化。关于戴帽作用及帽子的生物学意义尚未明确了解，但无疑它是有效合成蛋白质所必需的。帽子可保护 mRNA 免受核酸酶



水解，且提供一种识别特征，为蛋白质合成机件所识别（如被核糖体所识别）。

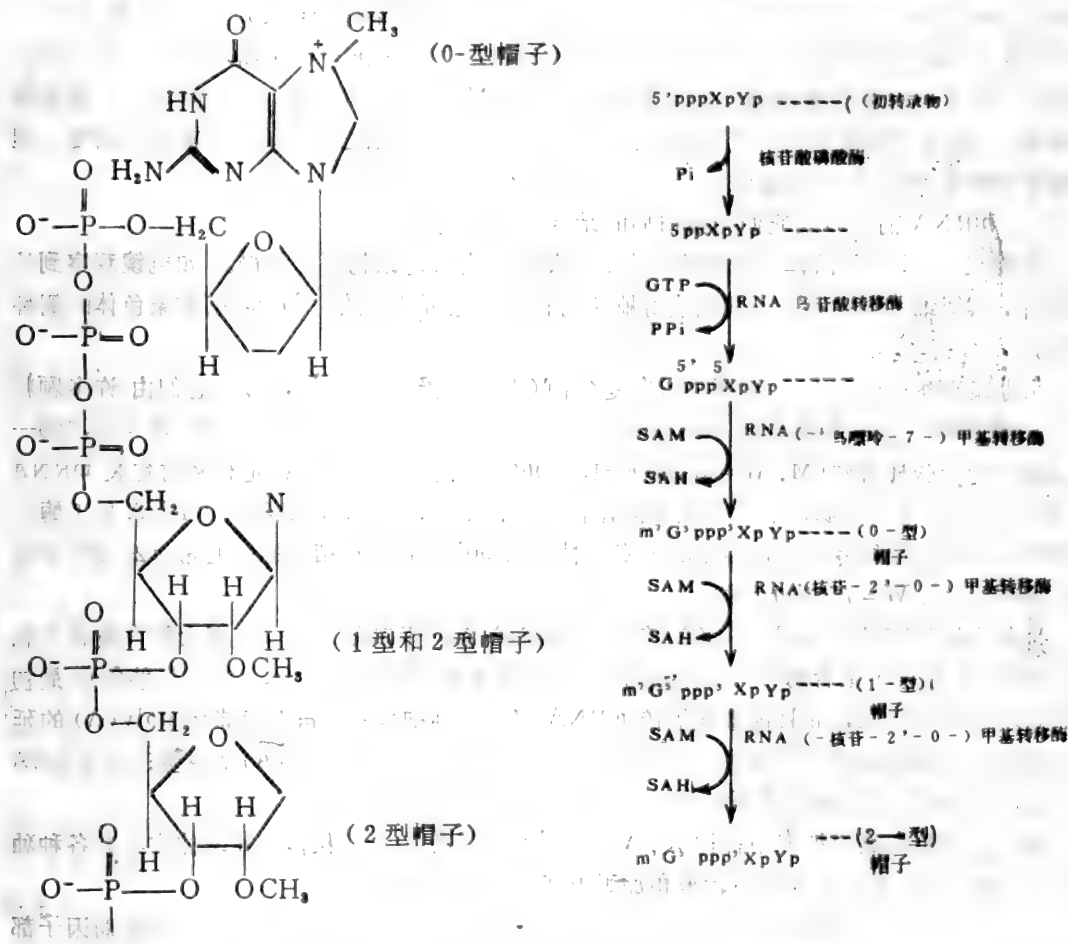
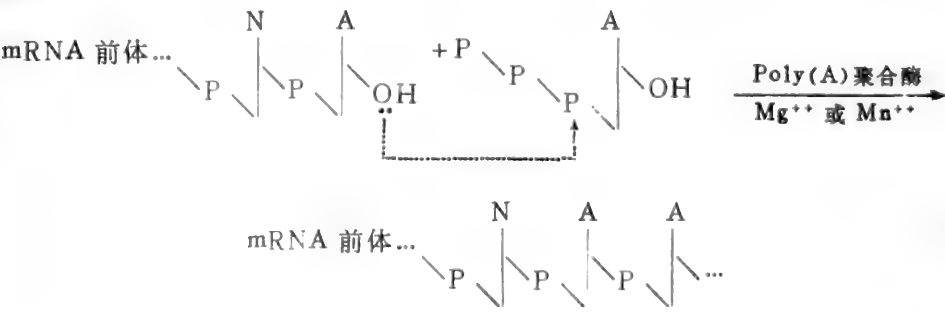


图13-46 真核 mRNA 各种带帽产物的形成过程 SAM 和 SAH 分别为 S-腺苷甲硫氨酸和 S-腺苷同型丝氨酸。

### 3. mRNA 前体 3'-poly(A)的加入及其功能

大部分动物 mRNA 分子 3'-端含 poly(A)尾巴。这个 poly(A)尾巴是在核酶- poly(A)聚合酶催化下，加到 mRNA 前体 3'-端的。如下式：



在 poly(A) 加入之前, mRNA 前体上首先要发生一个切割作用。因为正常的 mRNA 转录要经过 poly(A) 的加入部位。从 poly(A) 加入部位向 5'-端进行约 10—25 核苷酸处有一 AAUAA 序列, 该序列是用来识别 poly(A) 加入部位的。在 poly(A) 加入之前, 由于它的识别作用把多余的核苷酸切去, 然后再逐个加入 AMP 而成 poly(A)。这 poly(A) 聚合酶属末端 RNA 腺苷酸转移酶, 有些已获纯化。关于 poly(A) 尾巴的功能, 目前尚不清楚, 但无疑它能增加 mRNA 的稳定性。

#### 4. mRNA 前体以及它们与蛋白质的结合

在核中, mRNA 前体与蛋白质结合的证据已从各种超结构研究获得。如电镜观察到的长的核蛋白纤维, 不仅存在于两栖类灯刷染色体中, 也可从分散的 HeLa 细胞染色体的侧环看到。

用电镜观察这些核内的核糖核蛋白复合物 (RNA:蛋白 = 1:4), 显示它们由许多颗粒构成。聚颗粒中的单颗粒大小不同 (200—300 Å)。其中有少数主要肽 (M. W = 30,000—45,000) 和一些稀有肽 (M. W = 45,000—150,000), 前者可能起着稳定和密封包装 mRNA 前体的作用, 称为核心肽; 后者只是和前体暂时短暂结合, 可能是污染物或 mRNA 加工酶。前者在核内显示组织专一性, 但无品种专一性。与 poly(A) 段相结合的肽通常有 2—3 个主要肽, 特别是 M. W = 75,000 的肽。

近年来的研究表明 poly(A) 专一的 mRNA 结合蛋白和 poly(A) 聚合酶在抗性上相近。因此 poly(A) 聚合酶可与核中新合成的 mRNA 前体很好地结合, 它不仅能催化最初 poly(A) 的合成反应, 而且能继续护送 mRNA 经核质到细胞质, 再继续催化 poly(A) 的延伸。这个链的延伸或许可以保护 mRNA, 使之稳定而不被降解。poly(A) 结合蛋白和 mRNA poly(A) 区的结构关系尚不清楚。

除原核细胞和真核细胞中各种 RNA 的转录和加工外, 在线粒体和叶绿体中亦有各种独特的 RNA, 它们亦有其独特的转录和加工方式。

此外一些小的 RNA 噬菌体, 也能合成 RNA, 合成步骤及所包含的酶系和辅助因子都有其独特之处。

# 第十四章 蛋白质的生物合成

## 第一节 引言

蛋白质生物合成是所有生物物质生物合成中最复杂的，需要大量的酶和其它一些专一性大分子参与反应。在真核生物的蛋白质合成中，有70种以上不同的核糖体蛋白质参与合成；20或更多种酶来活化氨基酸；十几种或更多种辅助酶和其它专一性蛋白因子来起始肽链合成、肽链延伸和终止肽链；100种以上的附加酶来加工不同类型的蛋白质前体。此外还要有70或更多种的tRNA、rRNA参与，才能按一定mRNA的指令合成适当的蛋白质。也就是说要合成任何一种蛋白质，几乎需要三百种以上不同大小的分子协同作用才能完成，而且许多大分子还必需有组织地排布在复杂的有三维结构的核糖体上，按步骤有条不紊地进行反应。

蛋白质生物合成机制尽管很复杂，但生物体却能高速地进行这一合成反应。E. Coli核糖体制造含100个残基的多肽链只需5分钟。在每一个细胞中，几千个不同蛋白质的合成是受严密调控的。在一给定代谢环境中，某种蛋白质合成的时机及数量，都受严格控制。本章只介绍蛋白质生物合成的一些总过程，以及参与这过程的一些主要因子。

大量的事实已经说明，生物合成的各种蛋白质的氨基酸序列决定于DNA各分散区（基因）的核苷酸序列。DNA以半保留的方式进行精确的复制，从而稳定地传递遗传信息。DNA的转录是基因的信息从DNA转移到mRNA上的过程。最后以mRNA为模板在核糖体上把mRNA上的信息翻译成含二十种氨基酸的蛋白质。这个翻译过程也就是蛋白质在生物体内的合成过程。

## 第二节 遗传密码

### 一、遗传密码及其确定

蛋白质由二十种氨基酸构成，而mRNA只含四种核苷酸。四种核苷酸和二十种氨基酸，显然不能采取简单的一对一的对应关系来互译；二对一也不可能构成二十种氨基酸信号，因为 $4^2 = 16$ 。因此预计每种氨基酸至少要由三个核苷酸序列与之对应，才能满足氨基酸的信号，因为四种核苷酸的三核苷酸序列会有 $4^3 = 64$ 种，编码二十种氨基酸，以及肽链起始和终止信号等足有余。目前已有大量证据，证实这预计的正确性。称为三联体密码（Codon triplet）或密码子（Codon）。而且每种氨基酸所对应的密码子都已确定。

首先证实三联体密码的是Crick等，他们用二氨基吡啶诱导E. Coli T<sub>4</sub>噬菌体的rIA基因发生突变。该基因的A和B顺反子区中有一段决定噬菌体能否感染E. Coli K菌株。用二氨基吡啶诱变而使该DNA序列插入1、2、3个核苷酸或减去1、2、3个核苷酸，以观

察噬菌体对 E. Coli K 菌株的感染情况，结果证实了所预测的三联体密码子是正确的。其原理用一假设的 DNA 序列予以说明。如表14—1。

表14—1 DNA 序列加减 1、2、3 个核苷酸后三联体密码子的改变情况

| 删去或加入<br>核苷酸数 | DNA 序列                               |
|---------------|--------------------------------------|
| 0             | CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT.....     |
| +1            | CAT CANTCA TCA TCA TCA TCA T.....    |
|               | ↑                                    |
| +1 -1         | CAT CANTCT CAT CAT CAT CAT.....      |
|               | ↑  ↓                                 |
|               | A                                    |
| +2            | CAT NCANTCATC ATC ATC ATC AT.....    |
|               | ↑  ↑                                 |
| +3            | CAN TNC ANT CAT CAT CAT CAT CAT..... |
|               | ↑  ↑  ↑                              |

从表14—1看出，在从左向右读码时，如果插入一个核苷酸 N，则从插入点起右边各个密码子都会失常，这样的突变体在复制、转录、翻译时就会出现差错。如果这种情况发生在 T<sub>4</sub> 噬菌体中则噬菌体不能感染 E. Coli K 菌株。如果插入一个 N，又删去一个 A，则从插入点右边至删去点之间的各密码子都会出错，而从删去核苷酸起右边各个密码子又都完全恢复正常。如加入和删去的核苷酸离得很近，则只会造成少数密码子不正常，这样翻译所得的蛋白质就只有少数氨基酸不正常，其它氨基酸序列都是正常的。如果这少数氨基的改变，对噬菌体蛋白质的结构无显著影响，则它仍可感染 E. Coli K 菌株。但如果插入和缺失序列相差很远，则随着距离的增加，不正常密码子就会增加，噬菌体的正常率就会降低。由此类推，插入两个核苷酸的突变体，其翻译出的蛋白质会有很大缺陷，也许就不再发挥其原有功能了。如果插入三个核苷酸或除去三个核苷酸，则翻译出的蛋白质可能仍会表现正常。

以上结果充分说明，密码子在 DNA 中是采取连续的三联体来编码的，任何一点加入一个或两个核苷酸，就会改变三联体序列，而造成读码错误。但如果加入三个或减去三个核苷酸，则三联体序列又可恢复，原来 DNA 的信息即得以正常传递。

(一) 用各种人工合成模板在体外翻译蛋白质以确定密码子。

1961年 Nirenberg 等首先把人工合成的多聚 U (PolyU) 加入到无细胞的蛋白质合成体系和二十种氨基酸的混合物 (共二十组混合物每种混合物中分别含有一种用 <sup>14</sup>C 标记的氨基酸) 中，如果观察到只有苯丙氨酸参入到非酸溶性蛋白类似物中，产物为多聚苯丙氨酸。从而确定 mRNA 上的苯丙氨酸密码子为 UUU。后来用同样方法，以 Poly(A)、Poy(C)为模板 mRNA，合成了多聚赖氨酸和多聚脯氨酸，故而确定赖氨酸和脯氨酸在 mRNA 上的密码子为 AAA 和 CCC。

Khorana 等在体外进一步用杂聚核苷酸作为模板 mRNA 合成蛋白质，以确定其它氨基酸的密码子。如以 Poly(AC) (AC AC AC AC AC AC.....) 作模板 mRNA 时，合成的蛋白质类似物为 Thr 和 His 交替排列，但这不能决定 ACA 和 CAC 哪个密码子是 Thr 的，哪个是 His 的。后来他们进一步用 Poly(CAA) 为模板 mRNA 来翻译蛋白质，结果发

现由于起始读码点不同，产生了三种不同的多聚氨基酸产物。结果如下：

三种不同读码方式

三种不同产物

CAA CAA CAA CAA...

Gln-Gln-Gln-Gln.....

CAAC AAC AAC AAC...

Asn-Asn-Asn-Asn.....

CAACA ACA ACA ACA...

Thr-Thr-Thr-Thr.....

哪一种读码方式得哪一种产物尚不清楚。然而其中只有第三种密码子为 ACA 的读码方式与 Poly(AC) 中的密码子 相同。而 Poly(AC) 和 Poly(CAA) 生成的产物又只有 Thr 相同，从而肯定 ACA 是 Thr 的密码子。同时也就证明 CAC 是 His 的密码子。

按照同样方法，用 Poly(UC)、Poly(UUC)、Poly(UAUC) 等作模板 mRNA 在体外合成蛋白质而得出了大部分氨基酸的密码子。

(二) 用核糖体结合技术确定密码子

表14—2 遗传密码子

| 5'-OH 端<br>核 苷 酸 | 中 间 核 苷 酸 |     |      |      | 3'-OH 端<br>核 苷 酸 |
|------------------|-----------|-----|------|------|------------------|
| U                | U         | C   | A    | G    |                  |
|                  | Phe       | Ser | Tyr  | Cys  | U                |
|                  | Phe       | Ser | Tyr  | Cys  | C                |
|                  | Leu       | Ser | Stop | Stop | A                |
|                  | Leu       | Ser | Stop | Trp  | G                |
| C                | Leu       | Pro | His  | Arg  | U                |
|                  | Leu       | Pro | His  | Arg  | C                |
|                  | Leu       | Pro | Gln  | Grg  | A                |
|                  | Len       | Pro | Gln  | Arg  | G                |
| A                | Ile       | Thr | Asn  | Ser  | U                |
|                  | Ile       | Thr | Asn  | Ser  | C                |
|                  | Ile       | Thr | Lys  | Arg  | A                |
|                  | Met*      | Thr | Lys  | Arg  | G                |
| G                | Val       | Ala | Asp  | Gly  | U                |
|                  | Val       | Ala | Asp  | Gly  | C                |
|                  | Val       | Ala | Glu  | Gly  | A                |
|                  | Val       | Ala | Glu  | Gly  | G                |

stop 为终止密码子，\* 常作为起始信号。

Nirenberg 等将核糖体、氨酰-tRNA 和寡聚核苷酸三联体混合，让其在适当条件下反应后，将反应混合物注入硝化纤维滤器中，发现只有核糖体和与之相结合的氨酰-tRNA 和核苷

酸三联体能保留在滤器上，而自由的非结合态氨酰-tRNA 和三联体由于分子小而由滤膜流出。他们用了20种不同的氨基酸混同物，每种含有一种  $^{14}\text{C}$ -标记的氨基酸，让使形成氨酰-tRNA。根据硝化纤维滤膜吸附所附的  $^{14}\text{C}$ -标记氨基酸种类和实验所用的三联体序列，就可确定相应于该三联体的氨基酸。例如当所用三联体为 GUU 时，只有含  $^{14}\text{C}$ -标记-Val 的氨基酸混合物会使滤器上的吸附物带  $^{14}\text{C}$ -标记。如果用 UGU 或 UUG 而仍用带  $^{14}\text{C}$ -Val 氨基酸混合物，那么滤器上不会显放射性。除非改变带  $^{14}\text{C}$  的氨基酸混合物。如用带  $^{14}\text{C}$ -leu 的氨基酸混合物，则三联体为 UUG 时，滤器上即可以出现放射性。现在64种三联体均已人工合成，并进行了试验。50%以上的三联体可得出鲜明的结果。

根据以上二法所确定的氨基酸三联体密码子列于表14-2中。

### (三)应用突变体确定遗传密码子

遗传密码的确定证据是用遗传突变体所获得的。由于它是从完整细胞所得的结果，故特别有价值。现用人工诱变的烟草斑纹病毒(TMV)突变体所得结果予以说明。TMV RNA 用亚硝酸处理会发生两种变化，即脱氨作用使  $\text{C} \rightarrow \text{U}$ 、 $\text{A} \rightarrow \text{I}$  (I 在编码中相当于 G，所以  $\text{A} \rightarrow \text{I}$  也就相当于  $\text{A} \rightarrow \text{G}$ )。当用亚硝酸处理过的 TMV RNA 感染烟草，则烟草中会产生病毒突

突体，其蛋白质肽链中有某个氨基酸会被另一氨基酸所取代，这种取代相当于其密码子上  $\text{C} \rightarrow \text{U}$  或  $\text{A} \rightarrow \text{G}$ 。例如当突变体蛋白质中一个 leu 被 phe 取代时，就相当于  $\text{CUU} \rightarrow \text{UUU} (\text{C} \rightarrow \text{U})$ ，而当 Ala 被 Val 取代时，就相当于  $\text{GCA} \rightarrow \text{GUG}$  (即  $\text{C} \rightarrow \text{U}$ ， $\text{A} \rightarrow \text{G}$ )。后来从影响色氨合成酶 A 蛋白的突变体和不同种人血红蛋白的突变体获得了同样证据。图 14-1 表示 Pro 的三联体密码子 CCC 经脱氨而变为其它密码子的过程。

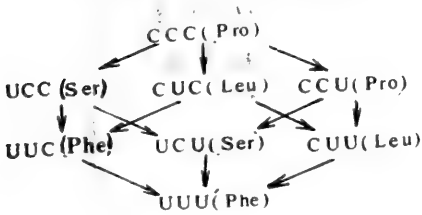


图14-1 密码子 CCC 经各种突变而成为其它密码子的过程

### (四)从已知蛋白质序列区的噬菌体 RNA 序列证实遗传密码的性质

在蛋白质和 RNA 的序列可以测定的基础上，1969 年 Sanger 发现 噬菌体 R<sub>17</sub> 有一段 mRNA 核苷酸序列，完全与其已知外壳蛋白的 81—99 位氨基酸序列相符。最近 Fiers 测定了噬菌体 Ms2 的全序列，肯定了所有遗传密码与相应氨基酸的对应关系。

通过以上几种方法所得的氨基酸遗传密码，证实了64个密码子中的61个。另外三个三联体(UAA、UAG、UGA)密码子不编码任何氨基酸，称为终止密码，其存在是通过一类无意义突变体 (nonsense mutant) 的研究而得以证明。无意义突变与一个氨基酸被另一个氨基酸取代的 误意突变 (missense mutant) 不同。UAG 称为琥珀密码子 (amber codon)，UAA 称为赭石密码子 (achre codon)，UGA 称为乳白密码子。这些名称是根据这些终止密码子所引起的突变类型而命名的。终止密码的确定，也是在体外翻译人工合成的 mRNA 中获得的。例如用 Poly(UAUC) 作模板 mRNA，从四个不同起始点进行翻译，结果如下，都得出 Tyr、Leu、Ser、Ile 重复序列的类蛋白聚合物大分子。

UAU CUA UCU AUC UAU CUA UCU AUC.....

UAUC UAU CUA UCU AUC UAU CUA UCU.....

UAUCU AUC UAU CUA UCU AUC UAU CUA.....

CUA UCU AUC UAC CUA UCU AUC UAU.....

↓翻译

Tyr-Leu-Ser-Ile-Tyr-Leu-Ser-Ile.....

Ile-Tyr-Leu-Ser-Ile-Tyr-Leu-Ser.....

Ser-Ile-Tyr-Leu-Ser-Ile-Tyr-Leu.....

Leu-Ser-Ile-Tyr-Leu-Ser-Ile-Tyr.....

然而当用 Poly(GUAA)为模板 mRNA, 来进行翻译时, 所得结果与上完全不同。这个模板所得结果如下。

GUA AGU AAG UAA GUA AGU AAG .....

G UAA GUA AGU AAG UAA GUA AGU .....

GU AAG UAA GUA AGU AAG UAA GUA .....

AGU AAG UAA GUA AGU AAG UAA .....

↓翻译

Val Ser Lys ? (三肽)

? Val Ser Lys ? (三肽)

Lys ?

Ser Lys ? (二肽)

由此可知翻译达 UAA 密码子时, 即停止翻译。从而可知 UAA 为终止密码子。

同样, 用 Poly(AUAG) 作模板 mRNA 进行翻译时, 得出 UAG 也是终止密码子。用 Poly(UGA) 作模板 mRNA 进行翻译时, 除了两个不同起始点得出了多聚甲硫氨酸和多聚门冬氨酸外, 没有其它多肽合成。证明 UGA 也是终止密码子。这些终止密码已通过对应于已知蛋白质的 DNA 和 mRNA 的序列分析被肯定。

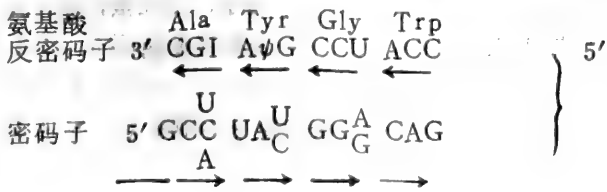
关于起终密码子问题, 是在所有密码子都确定后才被确定。在体外翻译时, 由于翻译可从任一碱基起始, 所以起始人们认为: 没有一个起始密码子可作为肽链的起始信号。然而 1964 年 Sanger 等发现 E. Coli 甲硫氨酰-tRNA 中的  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> 常被甲酰化成甲酰甲硫氨酰-tRNA(fMet-tRNA), 这样, 在 fMet 中就只有 -COOH 可与另一氨基酸的氨基形成肽键。后来又发现 E. Coli 中所得的各种蛋白质其 N-端 45% 为甲硫氨酸。因而推测在 E. Coli 中, 也许在所有细菌中蛋白质都起始于专一的 fMet 的密码子, 而在蛋白质形成后除去了甲酰基或 fMet 残基才成为成熟的蛋白质。后来用无细胞系统翻译噬菌体 R<sub>17</sub> 和 f<sub>2</sub> RNA 时, 发现体外合成的噬菌体外壳蛋白其 N-端序列为 fMet-Ala-Ser...。而在活体内合成的该蛋白质, 其 N-端序列为 Ala-Ser...。这可认为无细胞系统中缺乏去甲酰基的酶和氨肽酶活性。后来证实在完整细胞中确有这两种酶活性。

把起始 fMet 引到多肽链上的 tRNA 为  $tRNA^{fMet}$  或  $tRNA_f^{Met}$ ，而把 Met 引入多肽链中间的 tRNA 称为  $tRNA^{Met}$  或  $tRNA_m^{Met}$ 。这两种 tRNA 的核苷酸序列不同。它们虽都能接受 Met，但只有  $Met-tRNA_f^{Met}$  上的  $Met-\alpha NH_2$  可被甲酰转移酶催化甲酰化，这个酶以  $N^{10}$ -甲酰-FH<sub>4</sub> 作为甲酰基供体。而  $Met-tRNA_m^{Met}$  则不能被催化甲酰化。所以当原核生物中肽链起始时，AUG 密码子用甲酰甲硫氨酸 (fMet) 起始肽链，也就是把起始 fMet 引到 AUG 起始密码子上以起始多肽链的 tRNA 为  $tRNA_f^{Met}$ ，而把 Met 引到 mRNA 中间 AUG 密码子上形成多肽链的 tRNA 为  $tRNA_m^{Met}$ 。

## 二、遗传密码的简并性

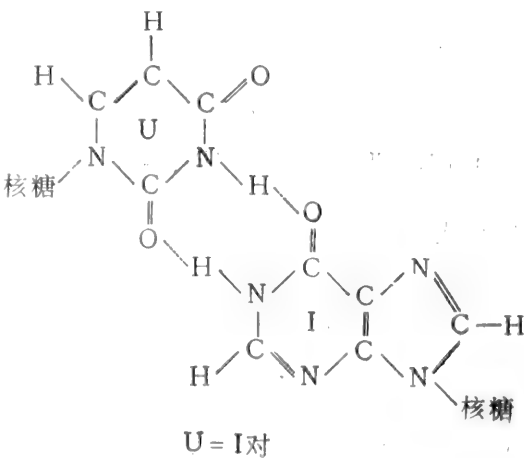
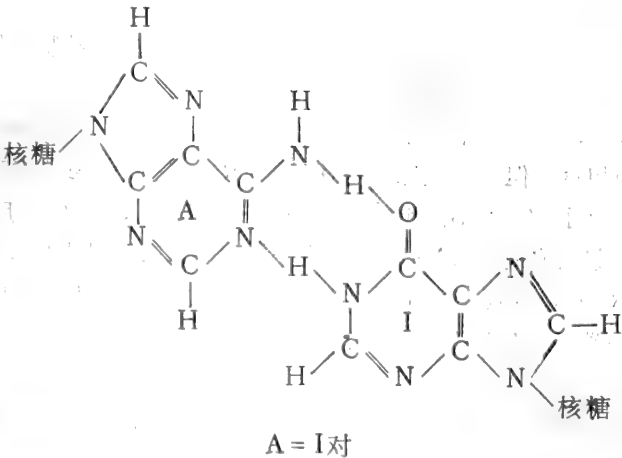
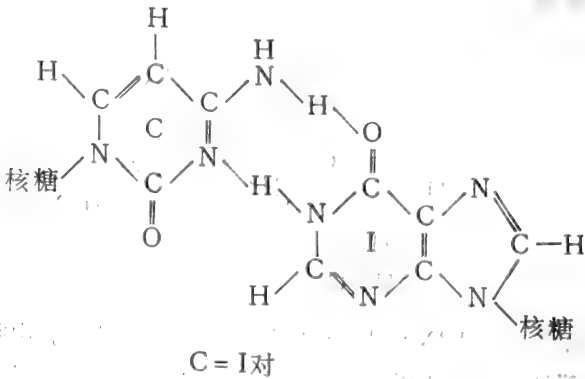
氨基酸只有二十种，而遗传密码子有64个，所以大部分氨基酸可利用几种不同的密码子 (见表14-2)，这称为密码子的简并性。但同一氨基酸的简并密码子，不是随机的而是有规律的。大部分简并三联体 5'-端和中间的核苷酸都相同，其简并只限于3'-端，即 3'-端不同。如 Val 的四个简并密码子为 GUU、GUC、GUA、GUG，前两个核苷酸都是 GU，只有 3'-端可以是 U、C、A、G 中任一种核苷酸。在有些情感下，3'-端都必需为嘌呤核苷酸 (A 或 G) 或嘧啶核苷酸 (C 或 U)。如 Gln 的简并密码子为 CAA 和 CAG，而 His 的简并密码子则为 CAU 和 CAC。遗传密码的简并性和各种密码子的特殊排列对防止突变的破坏性影响，保证生物种属的稳定性起重要作用。在密码子 3'-端发生一个核苷酸改变的突变，对所合成的蛋白质毫无影响。根据一些密码子的编排可以看出：如果 5'-端核苷酸改变，则对所合成的蛋白质性质影响亦不大。例如，一个突变使六个 Leu 密码子中的任何一个的 5'-端改变，所得的突变密码子都是疏水氨基酸的密码子，这样一种突变体可能不会损坏所合成蛋白质的特殊功能。

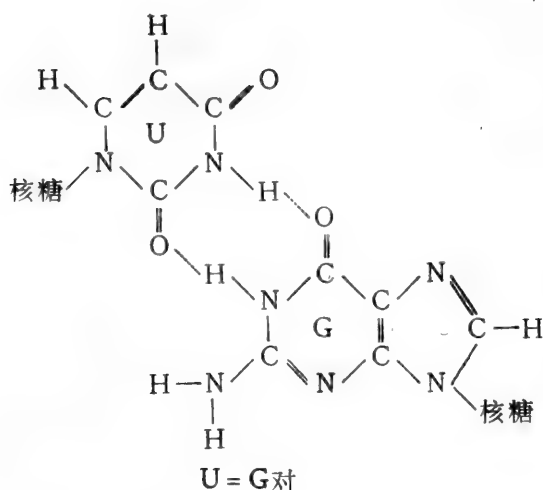
可以预计，每个密码子需要自己的 tRNA，它带有相应的反密码子。但有些个别的同功受体 tRNA 能识别相同的氨基酸。Crick 等证明：密码子的 3'-端和反密码子的 5'-端间的互补碱基对，可能具有较广的可变性，他们称为“变偶性”(Wobble)或摆动性。这种“变偶性”将使 5'-端反密码子识别简并密码子 3'-端的 U 和 C 或 A 和 G。他们认为从立体化学角度看，反密码子 5'-端 G (不是 A) 可与密码子 3'-端的 U 或 C 两者配对，反密码子 5'-端 U (不是 C) 可与密码子 3'-端的 A 或 G 两者配对。并且早已发现有些 tRNA 反密码子 5'-端为肌苷(I)，它可与 mRNA 上密码子 3'-端的 A、U 或 C 三者中任何一个核苷酸配对。这些可以解释已知的一些反密码子与密码子为什么有配对能力 (见下式)。变偶假说也能解释为





什么 phe、Tyr、Cys、His、Asn、Ser 和 Trp 等密码子所对应的反密码子 5'-端要阻止肌苷进入。因为这些密码子的 3'-端都是 U、C 简拼，如果反密码子 5'-端有 I 进入，势必会误读那些 3'-端带 A 的密码子，造成翻译上的错误。使蛋白质合成发生突变。关于 G 与 U，I 与 U、C、A 配对方式示如下式。





利用所纯化的已知序列的 tRNA 进行核糖体结合试验，从实验中所观察到的密码子与反密码子的识别模式，都证实了变偶假设的正确性，以及肌苷在许多 tRNA 反密码子中的限制性。

Crick 在推出变偶假说后，又发现了反密码子中的一些核苷酸的限制。如 Ile-tRNA 阅读密码子 AUA、AUC、AUU，其反密码子 5'-端就必需是肌苷 I，而决不能是 U，即一定要阻止 U 进入其 5'-端。否则，这个反密码子就会误读密码子 AUG。这与后来发现的两个习惯适用的 Ile-tRNA 序列相符。但有一点比较特殊，即 tRNA 在阅读起始密码子时具有变偶性。因为其它氨基酸的密码子 5'-端和中间的核苷酸往往是严格的，它们的反密码子也往往严格地与密码子配对。而起始密码子(fMet)有三种(AUG、GUG 和 UUG)，它们的 5'-端核苷酸不同，因此 fMet-tRNA 上的反密码子就具有一变偶对 3'-U，以适应于与 AUG、GUG，甚至与 UUG 密码子的 5'-端核苷酸配对。

除了上面所介绍的简拼 tRNA 反密码子可识别一个以上的密码子外，还有与一种密码子配对的同功受体 tRNA(iso-accepting tRNA)。这些同功受体反密码子相同，但其核苷酸序列中其它部位有变异。如 E.Coli 的 tRNA<sup>Tyr</sup><sub>1</sub> 和同功受体 tRNA<sup>Tyr</sup><sub>2</sub>，以及酵母 tRNA<sup>Ser</sup><sub>1</sub> 及其同功受体 tRNA<sup>Ser</sup><sub>2</sub>，后两者的比较如图 14—2。这些核苷酸序列上的差异，是由基因复制以及以后的突变所引起。可认为这样的基因复制，有助于保护机体，使它抵抗在 tRNA 上的灾难性突变。该图中 G 说明 tRNA<sup>Ser</sup><sub>1</sub> 中为 G，而 tRNA<sup>Ser</sup><sub>2</sub> 中则以 A 代 G。U 说明 tRNA<sup>Ser</sup><sub>1</sub> 中为 U，而 tRNA<sup>Ser</sup><sub>2</sub> 中则以 C 代 U。

到目前为止，有相当数目的 mRNA 全序列已经确定。从而可以看出：不同简拼密码的用途似乎不是随机的，而且在原核细胞和真细胞中优先被选用的密码子不同。例如真核细胞中密码子的 3'-端似乎优先选用 G 和 C，对两种起始密码子 AUG 和 GUG 的选用，AUG 大大超过 GUG。在 80 种已知的原核 mRNA 中，只有三种以 GUG 作起始密码子。迄今已知的 40 种真核细胞 mRNA 的起始密码子都是 AUG。

### 三、遗传密码的通性及其变异

用真核和原核细胞的 tRNA 所作的实验,表明两类 tRNA 能识别相同的密码子。这两类密码子的等同性也已为许多真核和原核细胞的 mRNA 核苷酸序列和细胞质蛋白质的氨基酸序列相一致所证实。但两类密码子也有很小的差别:即真核细胞质中专一与 AUG 匹配的起始 tRNA 负载 Met( $tRNA^{Met}$ )而原核细胞中的起始 tRNA 则负载 fMet( $tRNA^{fMet}$ )并与 AUG 匹配。

在线粒体系统中,发现某些 mRNA 的密码子与细胞质 mRNA 的密码子所对应的氨基酸有些不同。如酵母线粒体 ATP 酶亚基 9 中的第 46 个氨基酸为 Thr, 其 mRNA 上相对应的密码子为 CUA, 这个密码子在细胞质 mRNA 中则是编码 Leu 的。但在人、小牛等线粒体中, CUN 类密码子与细胞质中一样也只编码 Leu。人、小牛、酵母线粒体中有一共同密码子 UGA 编码 Trp, 而该密码子在, 胞质中则为终止密码子。另外在哺乳类动物细胞线粒体中有一密码子 AUA 用来编码 Met, 而在细胞质中该密码子则编码 Ile。在人细胞线粒体中, AGA 和 AGG 两个密码子为终止密码, 而在细胞质中这两个密码子都编码 Arg。线粒体 tRNA 与细胞质中 tRNA 的基本差别与上述被改变的 mRNA 密码子相对应。而且线粒体只含 24 种不同 tRNA, 这比细胞质中根据变偶假说阅读的最小密码子数(31)小。

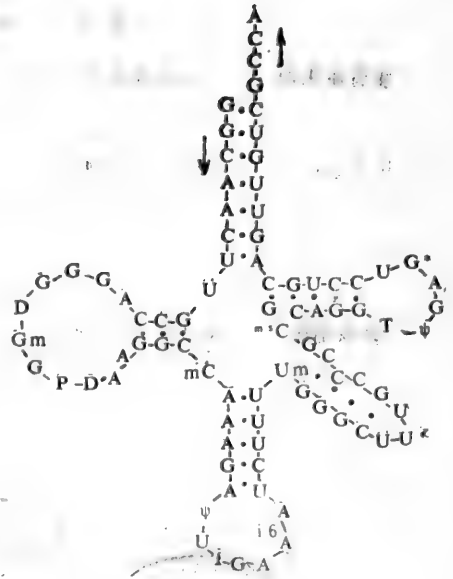


图 14-2 同功 tRNA<sub>ser</sub> 的结构

### 第三节 核糖体及其在蛋白质合成中的作用

核糖体是一个大的核糖核蛋白颗粒,在原核细胞中它以游离状态存在,或与 mRNA 结合形成串状多核糖体。平均每个细胞有  $10^4$  个核糖体。在真核细胞中,核糖体可以游离状态存在,也可与细胞内质网结合而存在。平均每个细胞有  $10^6-10^7$  个,叶绿体和线粒体中也有相应的核糖体。

所有核糖体都由两个亚基构成,其大小及所含 rRNA 种类和蛋白质种类见表 14-3 或图 14-3。在  $Mg^{2+}$  浓度为 10mM 时,两个亚基发生聚合;  $Mg^{2+}$  浓度降至 0.1mM 时则又解聚。原核细胞中的核糖体小亚基含一分子 16S rRNA, 大亚基含 5S 和 23S rRNA 各一分子。真核细胞中核糖体的小亚基含一分子 18S rRNA, 大亚基含 5S、5.8S、28S rRNA 各一分子。

原核核糖体的 30S 中的蛋白质称为  $S_1, S_2, \dots, S_{21}$ , 每一种蛋白分子只有一个拷贝。50S 中的蛋白质以 L 表示,除  $L_7$  和  $L_{12}$  外,每种也只有一个拷贝。 $L_7$  和  $L_{12}$  总共有四个拷贝。它们的相对数目决定于细菌的生长速度,  $L_7$  是  $L_{12}$  的 N-端为乙酰形式。 $L_8$  是一个复合物,由

表14—3 核糖体的构成单位及分子量

| 核糖体来源   | 亚基及其分子量                  | rRNA 及其分子量               | 蛋白质种数                                           |
|---------|--------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------|
| E. Coli | 70S( $2.7 \times 10^6$ ) | 30S( $0.9 \times 10^6$ ) | 16S( $0.51 \times 10^6$ ) 21                    |
|         |                          | 50S( $1.8 \times 10^6$ ) | M.W = 8,300 - 25,800                            |
|         |                          |                          | 5S( $4 \times 10^4$ ) 32                        |
|         |                          |                          | 23S( $0.98 \times 10^6$ ) M.W = 5,300 - 24,600  |
| 真核细胞    | 80S( $4.3 \times 10^6$ ) | 40S( $1.4 \times 10^6$ ) | 18S( $0.7 \times 10^6$ ) ≈ 30                   |
|         |                          | 60S( $2.8 \times 10^6$ ) | M.W = 11,200 - 41,500                           |
|         |                          |                          | 5S( $3.9 \times 10^4$ ) ≈ 50                    |
|         |                          |                          | 5.8S( $5.1 \times 10^4$ ) M.W = 11,500 - 41,800 |
|         |                          |                          | 28S( $1.7 \times 10^6$ )                        |

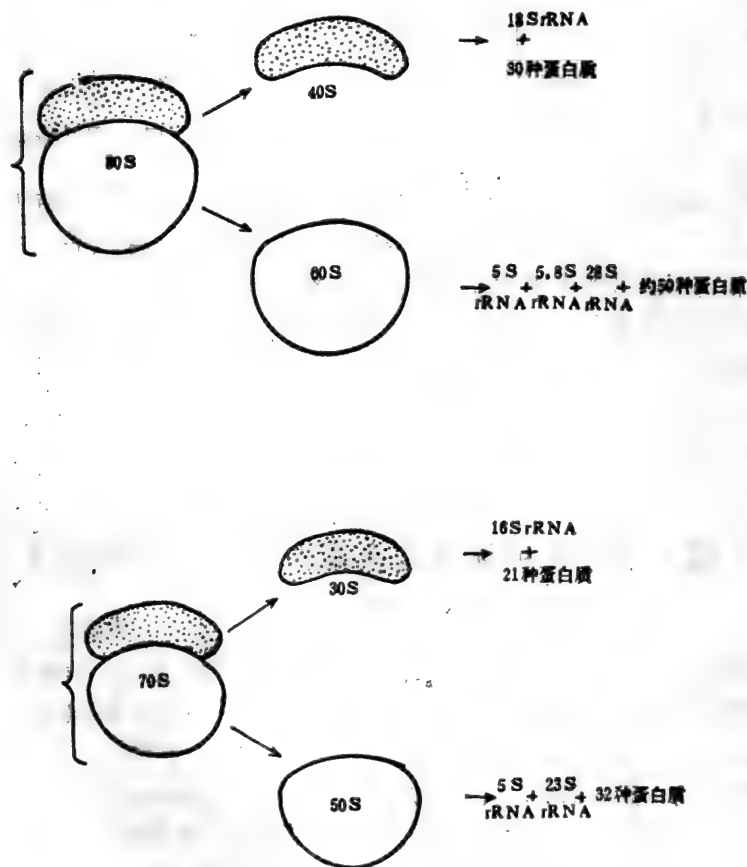


图14—3 原核和真核细胞质核糖体及其亚基大小和成分

一分子  $L_{10}$  结合  $L_7$  和  $L_{12}$  而成。 $L_{26}$  就是  $S_{20}$  蛋白。当 70S 亚基解聚时， $S_{20}$  蛋白离开 30S 亚基，与 50S 亚基结合。这些蛋白质大部分为碱性蛋白，其碱性氨基酸(Arg + Lys)含量可达

34%。这些碱性氨基酸与 RNA 有较强的结合作用。大部分核糖体蛋白的氨基酸序列已经确定。但真核的蛋白质目前尚未完全确定。

### 一、rRNA 在蛋白质合成中的作用

rRNA 的结构已在第四章作过介绍。它在核糖体上的功能有以下几方面。

(一)把一些重要的功能蛋白质组装在核糖体上，使核糖体成为具有高度结构的颗粒。

迄今已知有六种蛋白质( $S_4$ 、 $S_7$ 、 $S_8$ 、 $S_{15}$ 、 $S_{17}$ 、 $S_{20}$ )结合于 16S rRNA 的专一性区域，有14种蛋白( $L_1$ 、 $L_2$ 、 $L_3$ 、 $L_4$ 、 $L_6$ 、 $L_7$ 、 $L_{10}$ 、 $L_{11}$ 、 $L_{13}$ 、 $L_{14}$ 、 $L_{16}$ 、 $L_{20}$ 、 $L_{23}$ 、 $L_{24}$ )结合在 23S rRNA 的专一性区域。目前，rRNA 的核苷酸序列和蛋白质氨基酸序列都已弄清，而且人们也知道了蛋白质的哪个部位与 rRNA 的哪个部位相互结合。可以说通过这些专一性的蛋白质可以保护 rRNA 上的特殊区域。

(二)能正确选择蛋白质合成的起始密码子

Shine 和 Dalgarno 测定了 *E. Coli* 16S rRNA 的 3'-端序列，观察到有一个多聚嘧啶序列与 mRNA 不同部分非翻译区的多聚嘌呤序列互补。而且在  $R_{17}$  和相关噬菌体的外壳蛋白、A 蛋白和复制酶的 mRNA 的 AUG 起始密码子之前存在这种多聚嘌呤序列。它可与 16S rRNA 3'-端的 UGCCUCCA 序列互补。如图 14-4 和表 4-11。后来又发现其它 *E. Coli* 酶的 mRNA 也都有这种多聚嘌呤序列(表 4-11)。因此，人们认为：16S rRNA 的多聚嘧啶区可促进 30S 亚基和 mRNA 的起始密码子 AUG 区域的相互作用。这个假说回答了 30S 核糖体为什么能结合在起始密码子上，而不能结合在一个专为中间 Met 编码的 AUG 密码子上。近年来，随着完成序列测定的 mRNA 数的增加，这种多聚嘌呤互补区的存在更加得到了肯定。在 *E. Coli* 中已有 80 种 mRNA 存在这种互补区，这互补核苷酸区长约 3—9 个核苷酸(表 4-11)。

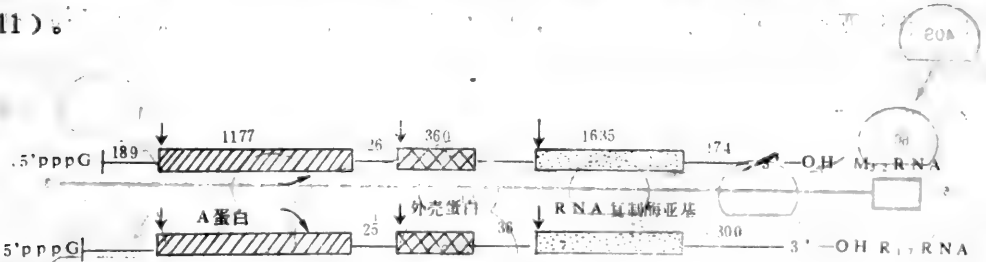


图14-4  $R_{17}$  和  $M_{13}$  噬菌体多顺反子 mRNA 的翻译区和非翻译区示意图

单线表示非翻译区，其它为各蛋白编码区。↓代表起始密码子 AUG 或 GUG 位置，数字代表核苷酸数。

这些互补作用是否存在，并且它是否就是选择起始密码子的机制，这些问题在人们发现了 mRNA 分子的起始区与 16S rRNA 的 3'-端直接结合后才得到肯定的回答。如用核酸酶处理一个由 *E. Coli* 噬菌体  $R_{17}$  A 蛋白 mRNA 和 *E. Coli* 核糖体 70S 形成的起始复合物，处理后分离得一杂交体，它是由 16S rRNA 3'-端约 50 个核苷酸区和噬菌体  $R_{17}$  A 蛋白 mRNA 起始点周围约 30 多个核苷酸区的碱基配对而成(如图 14-5)。

又如使一寡核苷酸与 16S rRNA 3'-端互补结合，就会阻碍 16S rRNA 与 Q $\beta$ -RNA 形成起

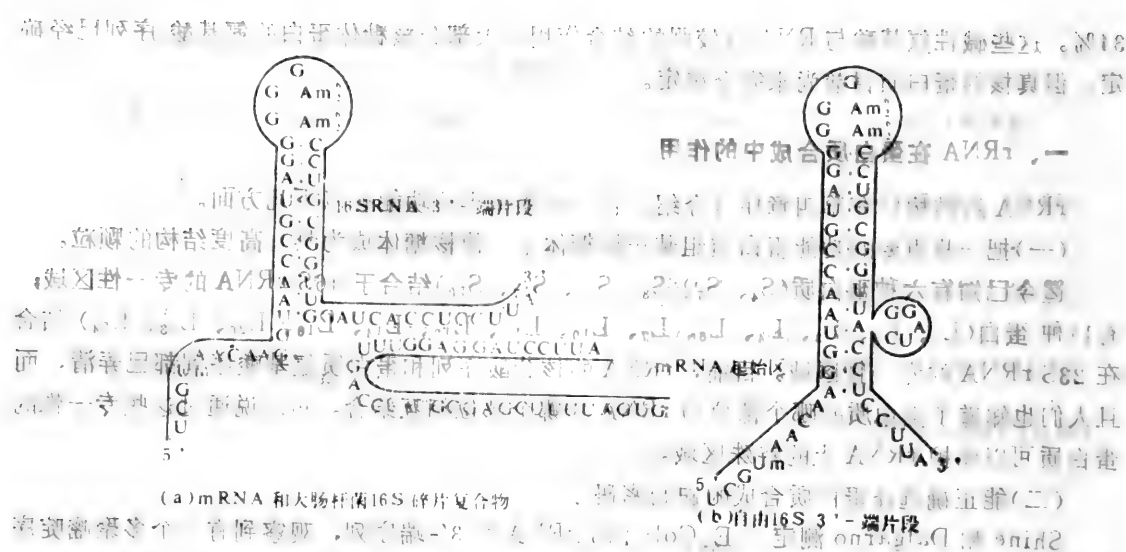


图14-5 16S 3'-端和噬菌体 R<sub>17</sub> A 蛋白 mRNA 起始区碱基配对情况

始复合物。后来又用其它噬菌体做实验，也证实了 16S rRNA 在正确选择起始密码子上所起的作用。这种 mRNA-rRNA 的相互作用，明显是起始翻译的必须条件。但这也不是充分条件，这样的一个相互作用实际上还要受二级结构等其他因素的影响。

真核细胞的 18S rRNA 和原核细胞的 16S rRNA 虽有许多共同序列，但真核细胞中似乎不存在<sup>5'</sup>ECUCC 这样的序列。真核细胞具有与原核细胞很不相同的选择起始密码子的方法。真核细胞起始蛋白质合成的理论称为扫描假说(scanning hypothesis)(如图14-6)。即真核细胞

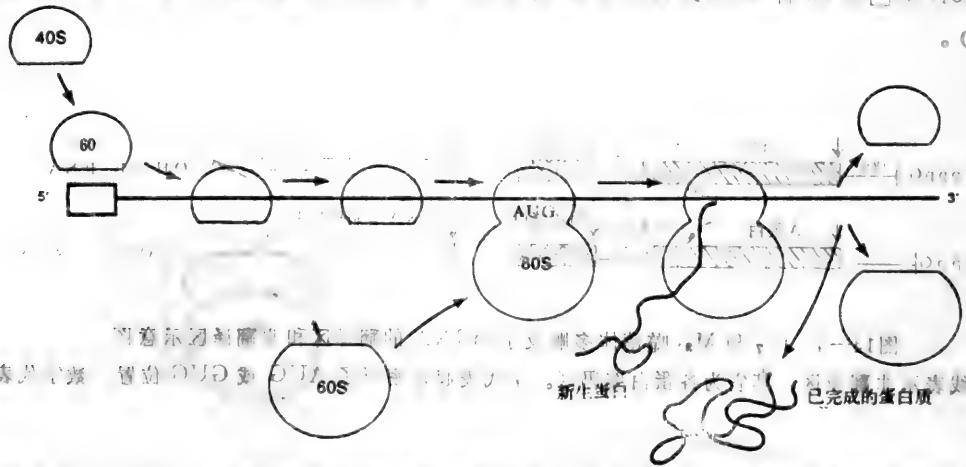


图14-6 扫描假说

40S 亚基结合于帽子附近，并向 3'-端漂移，停在 AUG 密码子处与 60S 亚基结合形成有活性的 80S 核糖体。当到达终止密码子后，80S 核糖体即解离。细胞核糖体结合到一个单顺反子 mRNA 的 5'-端或近 5'-端处，并且沿 mRNA 5'→3' 移行，待遇到 AUG 密码子后，立即形成起始复合物，建成阅读码框，并立即阅读一个个三联体密码

子,直至终止密码子为止。

### — (三) 16S rRNA 对 70S 核糖体形成 所起的作用

16S rRNA 3'-端序列和 23S rRNA 形成碱基对,可能在 30S 和 50S 亚基形成 70S 核糖体的过程中起作用。然而这互补碱基对的形成,只有当 16S rRNA 所采取的二级结构不同于与 mRNA 配对时所采取的方式时,才有可能。这两种互补性的相互排斥,可能是 IF-3 双重功能的分子基础。当 IF-3 与 30S 核糖体作用时,16S rRNA 3'-端的二级结构从能与 23S rRNA 相互作用的形式变为只能与 mRNA 5'-端相互作用的形式。但这假说尚缺乏直接证据。

### (四) rRNA 使氨酰-tRNA 与核糖体结合

在原核细胞 5S rRNA 内部有一守恒序列 CGAAC, 它和原核细胞 tRNA 中的守恒序列 GT $\psi$ CR 或真核细胞 tRNA 的守恒序列 GU $\psi$ CR 之间有互补性。所以可以设想:当氨酰-tRNA 结合到核糖体上时,这些 RNA 之间有可能通过碱基互补而起作用。寡核苷酸 T $\psi$ CG 可抑制氨酰-tRNA 与核糖体的非酶促结合,证实了这个假说。但 T $\psi$ CG 不抑制 Met-tRNA 对 80S 核糖体的结合。这可设想为:Met-tRNA 只与核糖体 A 位作用,或由于真核细胞起始 tRNA 含有 AUCG 而不含 T $\psi$ CG。原核细胞中 fMet-tRNA 只与 23S rRNA 作用,不与 5S rRNA 作用,也许能说明这一问题。所以 tRNA 中的 T $\psi$ C 环与 5S rRNA 的相互作用,还不能认为已被证实,因为 5S rRNA 的相关区域常被掩盖。

## 二、核糖体蛋白在蛋白质合成中的作用

核糖体蛋白大致有两方面的功能。一是组装核糖体本身;二是在组装好的核糖体上对蛋白质合成各步骤起催化作用。

### (一) 核糖体蛋白在组装核糖体上的作用

Nomura 采用从混合物中分别省去一种蛋白质,看它对组装活性核糖体亚基有无阻碍的方法,来组装 E. Coli 30S 亚基、嗜热杆菌 50S 亚基和 E. Coli 50S 亚基等。发现几乎所有蛋白质组分都是组装各活性亚基所必需的。

### (二) 在组装好的核糖体亚基上各蛋白质的功能

#### 1. S<sub>1</sub> 蛋白质的作用

一个核糖体蛋白质的特殊功能,离开组装好的核糖体亚基是无法确定的。在重组试验中,省去一给定蛋白质,常会导致所有蛋白质合成反应失活。核糖体蛋白质之间有广泛的协同性,以形成核糖体上下不同的催化部位和底物结合部位。蛋白质在核糖体上的定位,已广泛用亲和标记法进行了研究,并已建立了一个存在于各功能核糖体穴中的蛋白质图谱。有少数几个蛋白质的特殊功能已被肯定,但大部分蛋白质的功能尚未弄清。了解得最清楚的是 S<sub>1</sub> 蛋白。这是一个不规则的核糖体蛋白,它有较强的分子量 ( $M \cdot W = 61,000$  道尔顿),显酸性 ( $I_p = 5.0 - 5.5$ ),分子伸长,轴比为 10:1。它交联到 16S rRNA 的 3'-端,定位于 30S 亚基的起始蛋白质合成部位。它可以专一地从核糖体上除去,但除去 S<sub>1</sub> 蛋白的核糖体不能翻译天然 mRNA (如噬菌体 MS<sub>2</sub>RNA)。所以 S<sub>1</sub> 蛋白是翻译天然 mRNA 所绝对必需的。但缺 S<sub>1</sub> 蛋白的核糖体仍能翻译人工合成的多聚核苷酸如 Poly(U),亦能翻译变性的噬菌体 RNA。这些实验结果表明,S<sub>1</sub> 蛋白的功能可能是融解 mRNA 起始部位的二级结构,使 mRNA 能与核糖体正确地相互作用。用物理方法研究的结果表明,S<sub>1</sub> 蛋白能使 RNA 伸

展,如果阻碍  $S_1$  执行这一功能,就会使核糖体丧失蛋白质合成的能力。虽然它易从核糖体上除去,但它确实存在于伸长的核糖体上,因此它并不是蛋白质合成的起始因子,而只是一个对起始蛋白质合成有特定作用的核糖体蛋白。

## 2. $S_{12}$ 蛋白质的作用

另一个特别重要的核糖体功能蛋白是  $S_{12}$ 。通过对 *E. Coli* 核糖体突变体进行研究,发现  $S_{12}$  与翻译的真实性有关。通过一系列混合重组试验,让其中一个蛋白质来自突变体(抗链霉素突变体),而其余蛋白都来自野生型,最后发现在突变体中被改变了的  $S_{12}$  蛋白,在低浓度链霉素下会造成遗传信息的误读。但从未突变的链霉素抗性细菌中所得的  $S_{12}$  蛋白,与野生型的其它蛋白的重组混合物,在低浓度链霉素中误读程度则大大降低。另外从 *E. Coli* 噬菌体  $R_{17}$  RNA 的翻译中观察到:枯草杆菌核糖体只能翻译这个 RNA 的 A-蛋白顺反子,却不能翻译另外两个能被 *E. Coli* 识别的外壳蛋白和复制酶的顺反子。从两种细菌的核糖体蛋白重组核糖体的试验中发现: $S_{12}$  负责顺反子的选择,这说明  $S_{12}$  蛋白与 mRNA 有直接或间接的相互作用,但确切作用不清楚。

把省去单一组分实验和其它技术结合起来,确立了处于相邻近位置的一组蛋白质,它们为蛋白质合成时呈现转肽酶活性所必需。近年来又有人假定 L16就是肽酰转移酶,这尚待进一步证实。

## 3. GTP 酶的作用

GTP 酶活性与核糖体的基本功能有关,它包含  $L_7/L_{12}$  蛋白。这些多拷贝的酸性蛋白,包含于需延长因子 G(FEG)的GTP 酶反应中。在蛋白质合成的每一起始、延伸和终止作用中,需要一个  $L_7/L_{12}$  蛋白参与,但这些蛋白质本身并不能认为就是GTP 酶。 $L_1$  的作用与  $L_7/L_{12}$  类似。现又发现5S rRNA 和  $L_5$ 、 $L_8$  和  $L_{25}$  等的复合物具有GTP 酶活性。

# 第四节 蛋白质生物合成的过程及机制

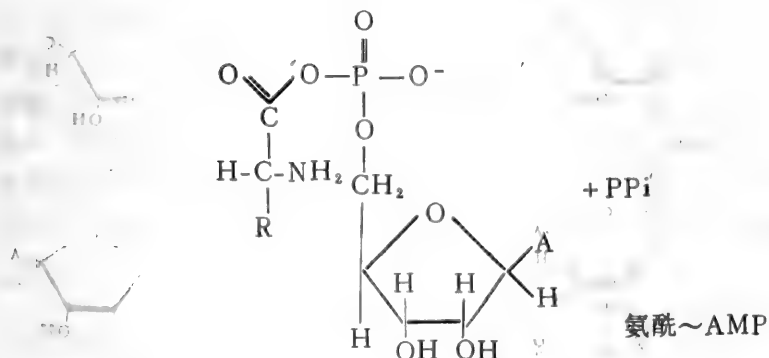
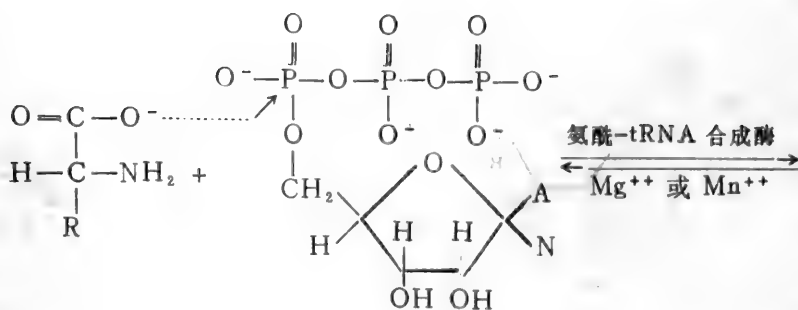
蛋白质的生物合成需要三种 RNA (mRNA、tRNA 和 rRNA)、ATP 和 GTP 以及一系列酶和蛋白因子参与。除氨基酸活化过程外,全部过程都在核糖体上完成。因此核糖体可看作蛋白质合成的工厂。蛋白质合成大致可分为氨基酸活化、肽链起始、肽链延伸和肽链终止等四个步骤。现分别介绍如下。

## 一、氨基酸的活化——氨酰-tRNA 的合成

各种氨基酸不能以自由形式在生物体内合成蛋白质。它必需首先经过活化,并载荷到 tRNA 分子上形成氨酰-tRNA 中间物后,才能按 mRNA 的指令合成指定蛋白质。氨酰-tRNA 的合成反应由氨酰-tRNA 合成酶负责催化。在酶的催化部位,此活化反应分两步进行。

第一步是氨基酸在酶催化下的活化反应。由氨基酸的羧基亲核攻击 ATP 的  $\alpha$ -磷原子形成氨酰腺苷酸(如下式)。





氨酰—AMP 是不稳定的但与酶结合后很稳定。

第二步反应是氨酰—AMP—酶复合物上的氨酰基转移到 tRNA 的 3'-端的腺苷酸上，这是 tRNA 3'-端的羟基氧，亲核攻击氨酰—AMP 上的氨酰 羰基碳而形成 氨酰-tRNA。反应如图14—7。

图中氨酰-tRNA 分子中的氨基酸以氨酰酯的形式与 tRNA 3'-端—OH 结合，也可与 tRNA 的 2'-OH 结合。2'-OH 和 3'-OH 两个部位上的氨酰基可以互相转移。氨酰酯键具有较高的水解自由能（约为  $-7.0 \text{ Kcal/mol}$ ）（在活化期间由 ATP 高能磷酸酐键转移而来），这可为以后形成肽键时提供能量。

尽管一种氨基酸可被几种 tRNA 载荷，但对一种氨基酸来说，似乎只有一种氨酰-tRNA 合成酶。甚至虽然参与起始和延伸的 tRNA 种类不同，但氨酰-tRNA 合成酶却是相同的。氨酰-tRNA 合成酶具有很高的专一性。许多酶已从不同生物体提纯，其  $M \cdot W \approx 5.4 \times 10^4 - 2.7 \times 10^5$  道尔顿。初看起来不同的氨酰-tRNA 合成酶具有很不相同的结构，有些是单肽链，有些是由大小不同的亚基构成的多亚基酶。但所有这类酶都由若干功能上相同的亚基或结构穴所构成，其  $M \cdot W \approx 30,000$  道尔顿。

各种氨基酸按 mRNA 密码的指令合成相应蛋白质。但对 mRNA 上密码子的专一性识别，则由 tRNA 的反密码子起专一性解码作用。一个氨基酸一旦已酶促载荷于其 tRNA 上，则即使再通过化学方法改变氨基酸的结构，tRNA 的解码功能依然不变。例如，使同位素标记的半胱氨酸在 CysH-tRNA 合成酶催化下与 tRNA<sup>CysH</sup> 结合成为 CysH-tRNA<sup>CysH</sup>。然后在 Ni 催化下，使 CysH-tRNA<sup>CysH</sup> 还原成 Ala-tRNA<sup>CysH</sup>。这样一种 氨酰-tRNA 带有

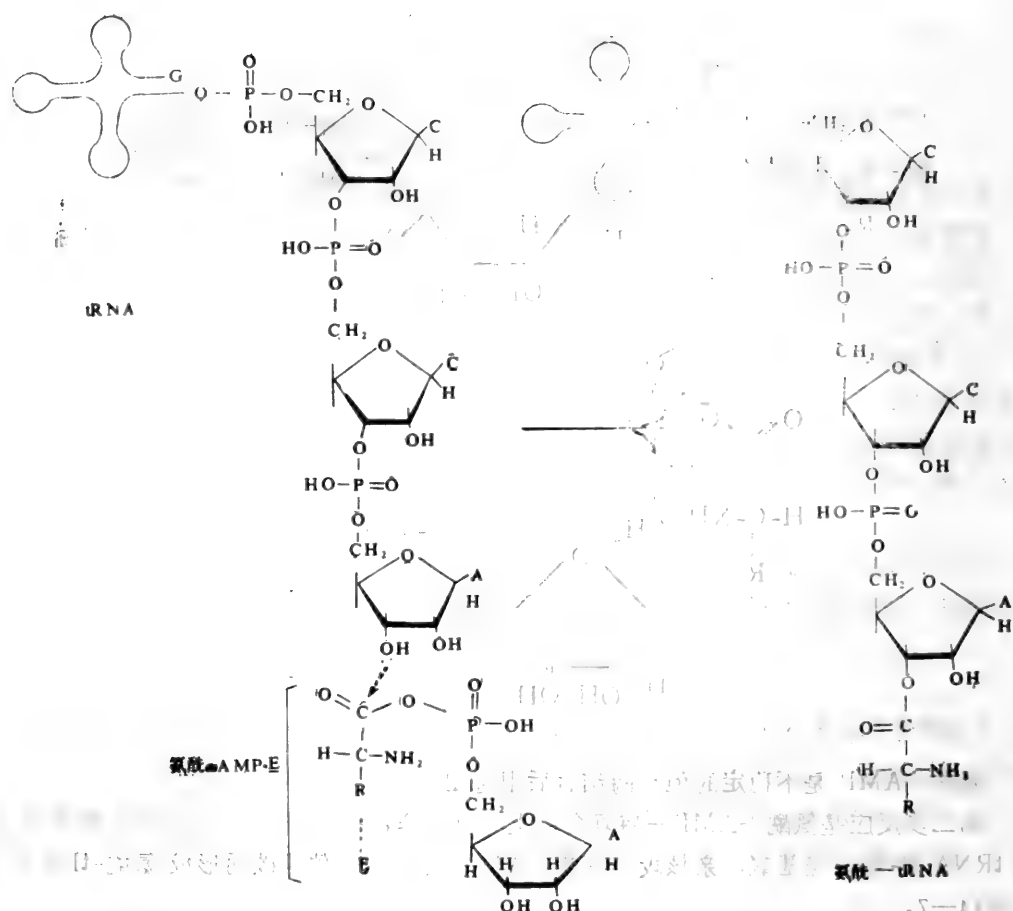
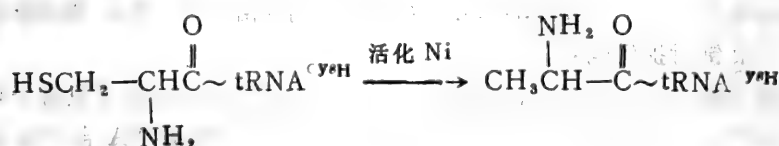


图14-7 氨酰-tRNA 合成反应 (E 为氨酰-tRNA 合成酶)



解CysH的反密码子,但所载荷的却不是 CysH 而是 Ala。把这种Ala-tRNA<sup>CysH</sup> 放到网织红细胞无细胞系统中,使之参与蛋白质合成反应。结果发现合成出来的血红蛋白,其原有 CysH 的位置被一个 Ala 代替了。这表明要保持解码的准确性,就要求氨酰-tRNA 合成酶既要能对氨基酸的识别有很高的专一性,又要对 tRNA 的识别有很高的专一性。否则一旦 tRNA 误载了一个氨基酸或一个氨基酸误乘了一个 tRNA 载体,造成的错误就无法弥补。

但事实上一些氨基酸之间的结构差异不大,它们的氨酰-tRNA 合成酶有时也会辨别失误。如 Val 有时会被 Ile-tRNA 合成酶识别,使 Val 形成 Val-AMP,并结合在 Ile-tRNA 合成酶上。一般活化225次即有一次会形成 Val-AMP。这就意味着合成一个含25个 Ile 的500个氨基酸的蛋白质,九个拷贝中的一个拷贝会发生错误。但事实并非如此,说明一定有

一校对机制来矫正 Val 和 Ile 的错误。现已弄清有一水解步骤能切除 Val-AMP，把 Val 从 Ile-tRNA 合成酶上除去，这个水解反应是由 Ile-tRNA 合成酶本身催化。该酶促活性在 Val 结合到 tRNA<sup>Ile</sup> 上以后才被活化。因此由于校对机制失败而真正产生 Val-tRNA<sup>Ile</sup> 的机会，只有 1/800。也就是说在蛋白质合成时，Ile 的部位被 Val 所占据的机会只有  $\left(\frac{1}{225}\right) \left(\frac{1}{800}\right) = \frac{1}{180,000}$ 。其它氨酰-tRNA 合成酶的错载和校对情况也研究过。错载的氨基酸一般比正确氨基酸小。比正确氨基酸大的氨基酸由于过大，不适于进入合成酶的活性部位，决不能被活化。即酶活性部位对氨基酸要进行一次初选，比正确氨基酸小的氨基酸虽亦能被活化，但由于不太适合酶的活性部位，活化速度较小。并且由于酶的水解活性部位太小，正确氨基酸又不能进入其中。而错被活化的小氨基，恰可进入酶的水解部位而被水解除去，这是氨酰-tRNA 合成酶对正确氨基酸的第二次筛选。这种筛选机制称为双筛选机制。有些氨基酸大小相等，形状也近似，如 Val 和 Thr。Thr 有时的确可被 Val-tRNA 合成酶活化，但由于这两个氨基酸侧链化学性质明显不同，故 Thr 可被其本身刺激的水解活性水解除去。Thr 的一OH 可与酶的水解部位形成氢键把 Thr 拉向亲水的水解部位。

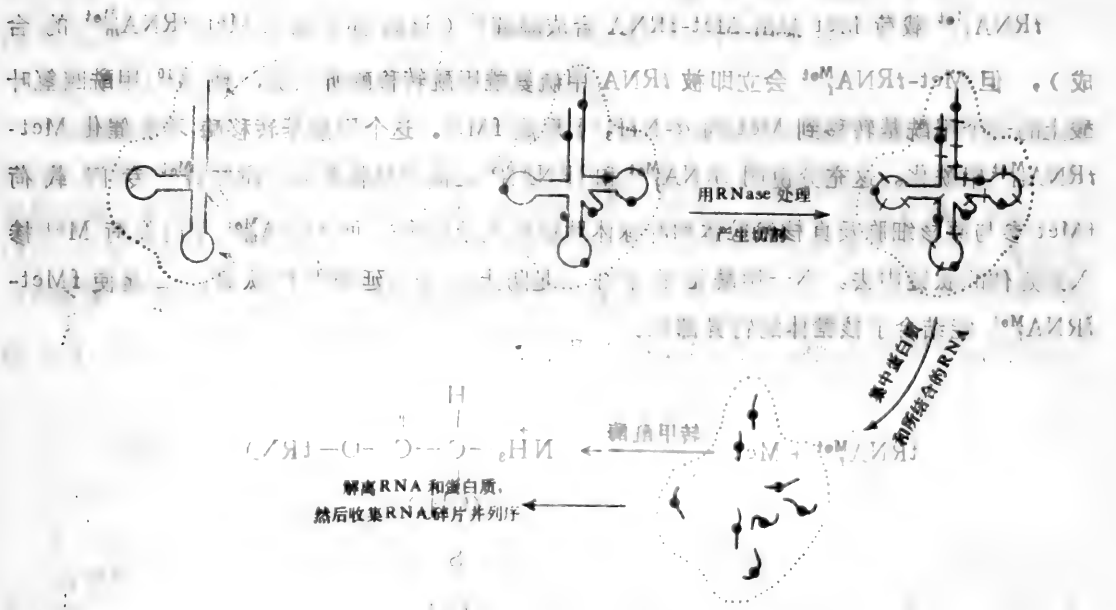


图14-8 tRNA 分子与其相关合成酶之间的结合点

tRNA 的形状都很相似，合成酶又是怎样识别各种 tRNA 的结构特点的呢？利用两种实验手段——光活化交联和对 RNase 的保护作用，测定出了 tRNA 分子上可与合成酶相互作用的区域。即首先让合成酶与 tRNA 分子结合成一复合物，并用紫外光照射使 tRNA 的碱基和酶中的氨基酸间形成化学键交联起来。这种交联只有在距离为 2 Å 或 3 Å 时才有可能。照射后用 RNase 水解，这时 tRNA 分子将会形成许多寡核苷酸碎片，而与酶蛋白结合的部分受到酶蛋白保护而未被水解。然后再把 RNA 碎片从酶蛋白上解离出来，经电泳后测定其序

列，即可知道 tRNA 与合成酶的许多相互作用位点。实验及结果如图14—8所示。几种合成酶-tRNA 复合物的研究表明，酶和 tRNA 不仅在许多位点有相互作用，而且这些接触点分布很广，从 tRNA 的接受基到反密码子环以及外加臂等都有接触。这些接触点一般沿 tRNA 三级结构中 L 形的内角分布。有时非匹配的 tRNA 和酶之间虽也有多点接触，但在该情况下，tRNA 的 C—C—A 氨酰化端不能正确地定位于酶的活性部位。所以酶的氨酰化专一性，不仅取决于专一性结合，也取决于每个 tRNA 分子的三维结构特点，这样的特点使其 C—C—A 的 3'-端 A 刚好定位于酶的活性部位。

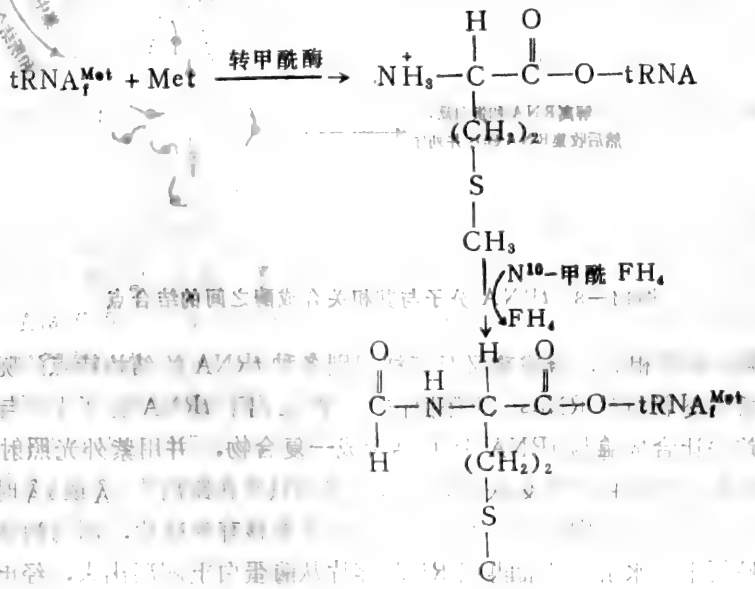
## 二、肽链的起始

### (一) 起始氨基酸

上面已经介绍过 E. Coli 及其它原核细胞肽链的合成是由 tRNA<sup>Met</sup> 携带甲酰甲硫氨酸，与密码子 AUG 配对而起始的。tRNA<sup>Met</sup> 具有几点不同于其它 tRNA 分子的特性。

1. tRNA<sup>Met</sup> 与 tRNA<sup>Met</sup> 携带的氨基酸不同

tRNA<sup>Met</sup> 携带 Met 是由 Met-tRNA 合成酶催化（该酶亦能催化 Met-tRNA<sup>Met</sup> 的合成），但 Met-tRNA<sup>Met</sup> 会立即被 tRNA 甲硫氨酰甲酰转移酶所识别，使 N<sup>10</sup>-甲酰四氢叶酸上的一个甲酰基转移到 Met 的 α-NH<sub>2</sub> 上形成 fMet。这个甲酰基转移酶不能催化 Met-tRNA<sup>Met</sup> 甲酰化。这充分说明 tRNA<sup>Met</sup> 和 tRNA<sup>Met</sup> 之间有结构差异。tRNA<sup>Met</sup> 专门携带 fMet 参与原核细胞及真核线粒体和叶绿体肽链的起始作用。而 tRNA<sup>Met</sup> 专门携带 Met 掺入到延伸的肽链中去。N-甲酰化的作用一是防止它进入延伸中的肽链，二是使 fMet-tRNA<sup>Met</sup> 能结合于核糖体的特异部位。



## 2. $tRNA^{Met}$ 的结构特点

核糖体上有两个 tRNA 的结合部位——A 和 P 位。载荷 fMet 的  $tRNA^{Met}$  在 A 位未被占据前首先进入 P-位，而其它氨酰-tRNA 则首先进入 A-位，只有在成肽以后才转移到 P-位上。因此  $tRNA^{Met}$  与其它 tRNA 相比需有一些结构特点。现在已经观察的特点有：5'-端碱基不与接受茎的对应碱基形成氢键，在  $tRNA^{Met}$  中不存在反密码子临近的 U 和某核糖间的氢键，而其它 tRNA 中则有此氢键存在，因而  $tRNA^{Met}$  的反密码环更为开放， $tRNA^{Met}$  的接受茎和 DHU 环与其它 tRNA 亦稍有差异，其密码子——反密码子间的相互作用亦与其它 tRNA 不同。上面已经介绍过反密码子的变偶性使它能识别简拼密码子，一般简拼密码子限于3'-端，而起始密码子的简拼性则在5'-端。虽然  $tRNA^{Met}$  主要识别 AUG，但它也能显著地与缬氨酸密码子 GUG 相互作用，也能较弱地与 Leu 的密码子 CUG 和 UUG 作用，这可能与反密码子环中缺乏氢键而更为开放有关。

## 3. 真核起始 tRNA 与原核起始 tRNA 的区别

真核细胞的起始 tRNA 与原核细胞的起始 tRNA 最显著的不同点是真核细胞的起始 tRNA 载荷 Met，该 Met 不能被甲酰化。所以它以 Met 引入起始肽链而不是以 fMet 引入起始肽链。真核细胞和原核细胞起始 tRNA 存在 AUC 或 A $\psi$ C 序列，以取代原核细胞起始 tRNA T $\psi$ C 环中的 T $\psi$ C 序列。但真核细胞起始 tRNA 与原核细胞中的一样，其5'-端碱基与对应接受碱基不形成氢键。真核细胞起始肽链的  $tRNA^{Met}$  和延伸的  $tRNA^{Met}$  虽都只载荷 Met，但特性亦不同，故起始  $tRNA^{Met}$  亦常用  $tRNA_i^{Met}$  表示，藉以与  $tRNA_{am}^{Met}$  区别。

### (二) 肽链的起始过程及作用因子

#### 1. 原核细胞中肽链的起始

这个过程分三个步骤：

##### (1) 前起始复合物的形成

前起始复合物的形成需要三种起始因子 (IF-1、IF-2、IF-3) 协同作用，在高  $Mg^{+}$  浓度下用人工合成的 mRNA 进行翻译时不需要这三个因子。但在生理  $Mg^{+}$  浓度下翻译天然 mRNA 时，这些因子是必需的。在细胞内的  $Mg^{++}$  浓度下，70S 核糖体是不会解离的，但形成前起始复合物又必需自由的 30S 亚基。IF-1 的功能是加速  $70S \rightleftharpoons 30S + 50S$  的平衡反应，因而加速 30S 上 IF-3 结合部位暴露的周期。一旦 30S 被解离出来，IF-3 即与之紧密结合。然后它才能与 IF-2 结合形成前起始复合物。IF-3 结合部位位于 16S rRNA 3'-OH 端邻近处，它直接或间接有利于识别天然 mRNA 起始密码子 AUG 前的非翻译区前导序列。由于 E·Coli 噬菌体等 mRNA 为多顺反子 mRNA，故每个顺反子都有分离的起始部位，有些远离其 5'-端，难以一一识别。16S rRNA 中有一 Poly(Py) 序列能与 mRNA AUG 前的前导序列 Poly(Pu) 互补，使 mRNA 与 16S rRNA 形成复合物。在 30S 上的 S<sub>1</sub> 蛋白的功能

是融解 mRNA 起始部位及 rRNA 的二级结构, 使发夹形结构伸展, 并形成复合物, 然后使 IF-3 能结合到 mRNA-16S rRNA 复合物上, 使该复合物得以稳定。

### (2) IF-1、IF-2 的作用

IF-2 的首要功能是在一需 GTP 的反应中, 使 fMet-tRNA<sup>Met</sup> 结合于核糖体上, 然后正确地结合于 mRNA 的起始密码子的位置上。而这一作用又为 IF-1 所刺激。当 tRNA<sup>Met</sup> 结合后, IF-3 即离开复合物。还不知道在活体内 mRNA 和 tRNA<sup>Met</sup> 谁先与复合物结合。已经知道在体外有不稳定的三元复合物 (IF-2-fMet-tRNA<sup>Met</sup>-GTP) 存在, 但尚不知这三元复合物是否确实在活体内存在或存在于 30S 亚基上。无疑 IF-2 和 fMet-tRNA<sup>Met</sup> 之间有多点作用, 而且 IF-2 专一地识别 tRNA<sup>Met</sup> 上的特殊结构, 它决不会与其它氨酰-tRNA (包括 Met-tRNA<sup>Met</sup>) 相互作用。

### (3) 70S 起始复合物的形成

mRNA-fMet-tRNA<sup>Met</sup>-30S 复合物一旦形成, IF-3 即离开复合物, 使 30S 与 50S 结合的部位暴露出来。50S 结合后, IF-1 离开 30S 颗粒。通过 30S 和 50S 亚基上 S 和 L 蛋白的配合, 核糖体上即形成了 P-位和 A-位两个部位。P-位被 tRNA<sup>Met</sup> 占据, A-位则被 IF-2 占据。要使第二个载荷氨酰基的 tRNA 进入 A-位, 必需把 A-位空出来。这时一个 GTP 酶在 A-位被活化, 使 GTP 水解成 GDP 和 Pi。没有 GTP 存在, IF-2 即离开 A-位。fMet-tRNA<sup>Met</sup> 在 P-位上的定位, 决定于 fMet 和 tRNA<sup>Met</sup> 的相互作用, 也取决于是否有专一的核糖体蛋白作媒介。例如, 某种交联剂能使 fMet 与 L<sub>2</sub> 和 L<sub>27</sub> 蛋白结合。

原核细胞肽链的起始如图 14-9。

### 2. 真核细胞中肽链合成的起始

真核细胞中蛋白质合成的起始, 包括 80S-Met-tRNA-mRNA 复合物形成的一系列反应。它与原核细胞最根本的差异是: 它包含许多不同的起始因子, 至少有下列九种 (除有人称为 24,000 蛋白的 eIF-4E 外, 其它都是根据大量不同工作所确定的共同名称), 即 eIF-1、eIF-2、eIF-3、eIF-4A、eIF-4B、eIF-4C、eIF-4D、eIF-4E 和 eIF-5。这些因子所起的作用是促进起始步骤中一个或几个反应。它与核糖体蛋白相反, 在 80S 起始复合物形成后, 即被释放出来。图 14-10 是真核细胞蛋白质合成的示意图。关于真核细胞蛋白质合成的起始详情已知的有以下几点。

① eIF-3 和 eIF-4C 促进 80S 的解离。这两种因子与游离 40S 亚基结合削弱了 40S 与 60S 亚基的结合。因此又称 40S 和 60S 的抗结合因子。40S·eIF-3·eIF-4C 颗粒提供了其它成分结合的靶子。

② eIF-2 已知有  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  三个亚基, 其中  $\alpha$ -亚基包含于与 GTP 的结合中,  $\beta$ -亚基在 Met-tRNA 和 mRNA 的识别中起作用。

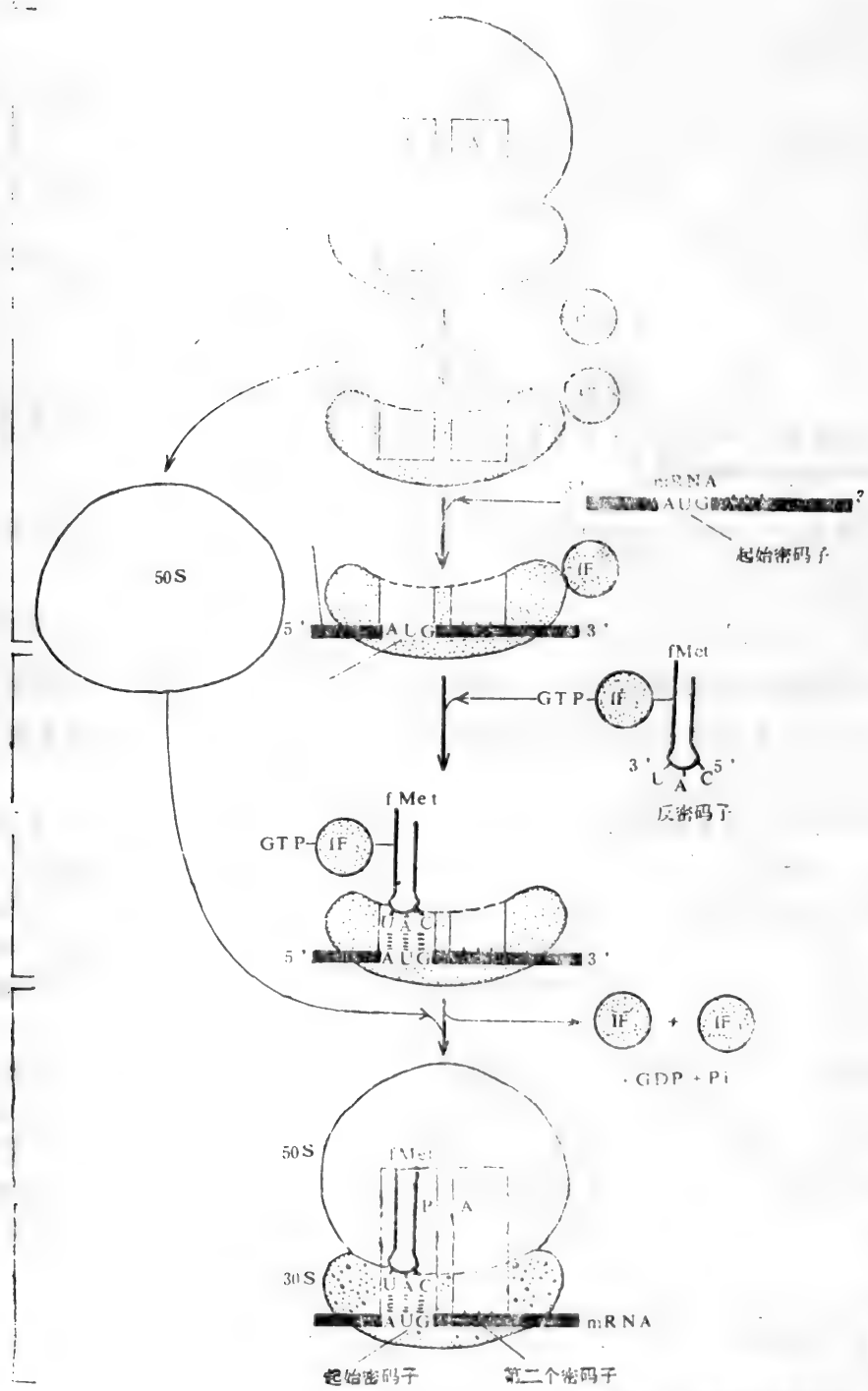


图14-9 原核肽链的起始复合物形成过程

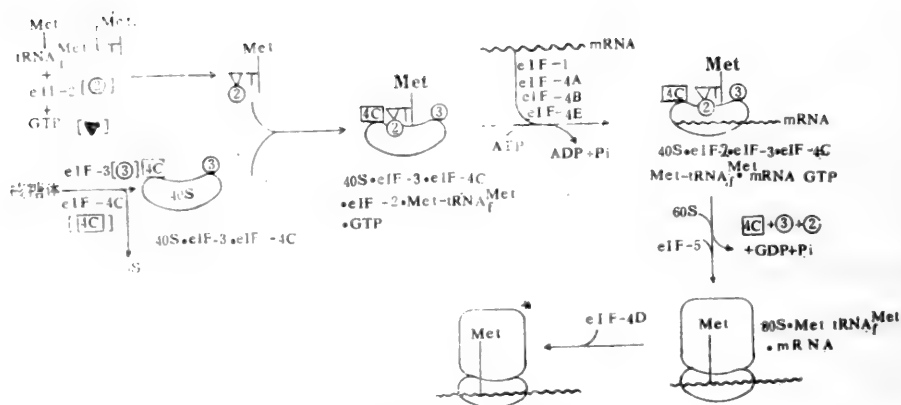


图14—10 真核细胞蛋白合成起始示意图

• 复合物与前一复合物不同，能与第二个氨酰-tRNA 反应。在  $\text{Met} \cdot \text{eIF-2} \cdot \text{GTP}$  复合物形成时可能还有  $\text{eIF-2A}$  起到刺激作用。

③  $\text{eIF-2}$  同  $\text{GTP}$  和  $\text{tRNA}_{\text{Met}}^{\text{Met}}$  形成三元复合物，此复合物很稳定，但  $\text{Met-tRNA}_{\text{Met}}^{\text{Met}}$  不能为其它氨酰-tRNA 取代。

④  $\text{Met-tRNA}_{\text{Met}}^{\text{Met}} \cdot \text{GTP} \cdot \text{eIF-2}$  复合物结合到  $40\text{S}$  亚基上，受  $\text{eIF-3}$  和  $\text{eIF-4C}$  促进。 $\text{eIF-4C}$  还能稳定这种结构，并使  $\text{Met-tRNA}_{\text{Met}}^{\text{Met}}$  同  $40\text{S}$  的结合力提高  $1.5-2.0$  倍。

⑤ 只有首先形成  $\text{eIF-2} \cdot \text{GTP} \cdot \text{Met-tRNA}_{\text{Met}}^{\text{Met}}$  三元复合物，此复合物才能与  $40\text{S}$  结合，并进行其它复合反应。

⑥ mRNA 与  $40\text{S}$  的结合必需有  $\text{ATP}$  的水解。并且可能有  $\text{eIF-1}$ 、 $\text{eIF-4A}$ 、 $\text{eIF-4B}$ 、 $\text{eIF-4C}$ 、 $\text{eIF-4E}$  和  $\text{eIF-3}$  等因子在这一步骤中参与反应。其中  $\text{eIF-3}$  非常复杂，至少是由八个独立多肽构成的多聚体 ( $M \cdot W = 700,000$  道尔顿)。以上许多蛋白质因子，可能在某种程度上与真核 mRNA 的特殊  $5'$ -端结构有关。也与蛋白质合成的翻译调节有关。 $\text{eIF-4E}$  是一个蛋白质因子， $M \cdot W = 24,000$  道尔顿，其最初称为  $24,000$  蛋白因子，有与 mRNA “帽子” 结合的活性。

⑦ 到目前为止没有发现 mRNA 上有前导序列可与  $40\text{S}$  中的  $18\text{S}$  rRNA 配对结合。因此 mRNA 与  $40\text{S}$  的结合模式也许是一个  $40\text{S}$  亚基结合在 mRNA  $5'$ -端，这种结合可被 mRNA “帽子” 结构所促进。其后在  $\text{ATP}$  水解供能的情况下， $40\text{S}$  亚基向 mRNA  $3'$ -端移动，在遇到 AUG 起始密码子后， $40\text{S}$  亚基即停止在那儿。 $\text{eIF-1}$  的作用可能是通过协调  $\text{Met-tRNA}_{\text{Met}}^{\text{Met}}$  反密码子与起始 AUG 的相互作用，使  $40\text{S}$  亚基停止移动。并在那儿同  $60\text{S}$  亚基进行结合。

⑧ 在真核细胞系统中还发现了多胺组分，能部分地代替  $\text{Mg}^{++}$ ，大大加强起始作用。

### 三、肽链延伸步骤及机制

#### (一) 原核肽链的延伸



原核细胞中的70S 起始复合物一旦形成，即  $fMet-tRNA^{Met}$  一旦结合于 70S 亚基的 P 位，肽链即开始延伸。延伸分三步进行，周而复始。

1. 按 mRNA 指令一个载荷某氨基酸的 tRNA 结合于 70S 的 A 位上。这一步需要 GTP 和两个延伸因子 EF-Tu 和 EF-Ts 参加。EF-Ts 是一个稳定的蛋白因子 ( $M \cdot W = 31,000-34,000$  道尔顿)。EF-Tu 是一个膜结合蛋白 ( $M \cdot W = 42,000-48,000$  道尔顿)，在细胞中其数量比 EF-Ts 多许多倍。这两个因子常以二聚体状态存在 (EF-Ts $\cdot$ EF-Tu)，它与 GTP 反应则生成 EF-Tu $\cdot$ GTP。但 EF-Tu 不能直接与 GTP 反应。EF-Tu $\cdot$ GTP 和氨酰-tRNA 结合则形成可溶性三元复合物氨酰-tRNA $\cdot$ EF-Tu $\cdot$ GTP。所有氨酰-tRNA 除  $fMet-tRNA^{Met}$  外都能形成此复合物。此三元复合物再与 70S 起始复合物反应，氨酰-tRNA 即与 mRNA 第二个密码子配对，并结合于核糖体的 A 位上。这时一个核糖体蛋白具有 GTP 酶活性，使 GTP 水解，以 EF-Tu $\cdot$ GDP 形式释放，它再与 EF-Ts 反应，GDP 释放，EF-Tu $\cdot$ EF-Ts 复原，(它可再与 GTP 反应，生成 EF-Tu $\cdot$ GTP 供下一轮延伸反应之用)。而氨酰-tRNA 则留在 A 位以便形成肽链。这是肽链延伸的第一步，见图 14-11。

## 2. 形成肽链

这是 A-位上氨酰基的  $\alpha-NH_2$  对 P-位的甲酰甲硫氨酰或肽基的羰基碳进行亲核攻击，而使 P-位的 fMet 或肽基与 A 一位氨酰基的氨基形成肽键。从而 A-位上就占据了一个肽酰-tRNA，而 P-位上只剩下一个空载的自由 tRNA。反应见 628 页。这一反应由 50S 核糖体亚基上的肽酰转移酶中心的催化活性来完成的。这个酶促活性区至少

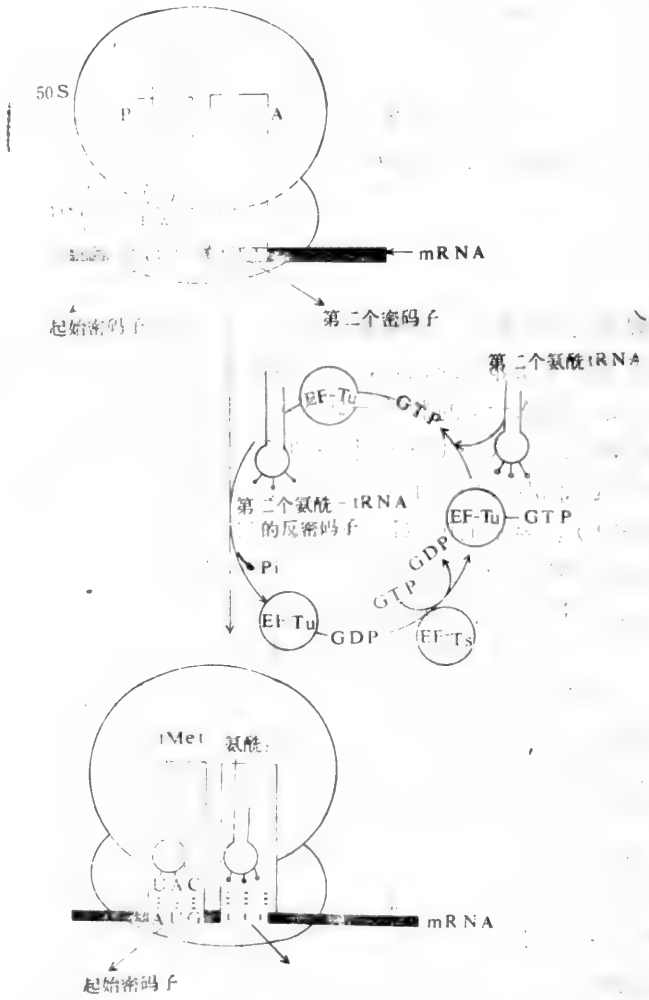
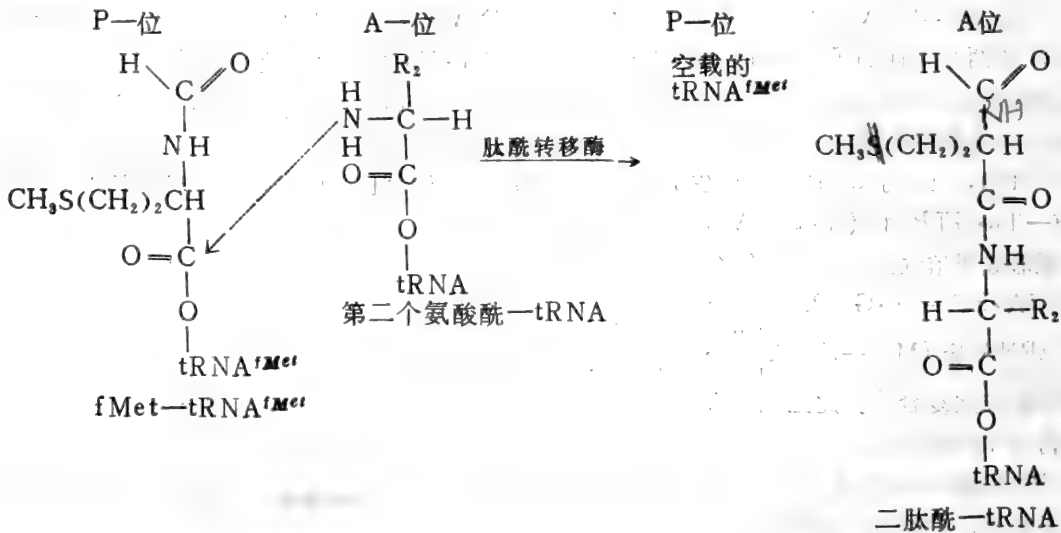


图 14-11 肽链延伸图。延伸中的第一步是结合第二个氨酰-tRNA 于 50S A 位上，该氨酰-tRNA 必需先与 EF-Tu 和 GTP 结合成三元复合物才能进入 A 位。第二个氨酰-tRNA 的结合伴随着三元复合物上的 GTP 水解成 GDP。与 EF-Tu 结合的这样的 GDP 可重新被 GTP 磷酸化，这一反应被 EF-Ts 所催化。

包括十种50S核糖体蛋白,如  $L_7/L_{21}$  等。这两个蛋白是不寻常的,具有高Ala含量和高螺旋度,好象肌肉中的肌球蛋白。有人设想它们可能象一个小肌肉(mini-muscle),用GTP



水解产生的自由能,使核糖体复合物上一些部分发生位移,把P-位的肽酰基和A-位的氨酰基带到相互邻近的位置,供肽酰转移酶更好地催化这一亲核取代反应。

3. 把A-位的肽酰-tRNA 转移到P-位, 并把P-位的空载 tRNA排斥出去成为游离的tRNA。这一步需要另一种延伸因子EF-G 参与, 并消耗一个GTP。在这一步中,mRNA 向5'-端移动一个密码子, 即核糖体沿 mRNA 5'→3' 方向滑动一个密码子(见图14-12)。关于EF-G 的作用,了解得还不清楚,但很明显,它邻近于L<sub>7</sub>和L<sub>12</sub>蛋白,且可与EF-Tu 竞争结合部位。已知GTP 的水解是移位所必需的,游离的tRNA 一定要在EF-G 结合后才从P-位释放。关于肽链延伸的全过程可简单示意如图14-13。

### (二)真核细胞中肽链的延伸

真核细胞肽链的延伸至少需要四种延伸因子。这些因子在不同组织中的结构及大小可能不同,常常形成集合体,至少含有50个单体。就功能而论,相当于E·Coli 的延伸因子的有:eEF<sub>1α</sub>(M·W=50,000道尔顿)。其功能类似于EF-Tu,可与GTP和氨酰-tRNA 有形成元复合物。eEF-1β(M·W=26,000道尔顿)功能与EF-Ts 相似。eEF-1γ 在E·coli中不存在。还有一个延伸因子eEF-2,很象原核中的EF-G,在转位反应中起作用。当P-位的肽酰-tRNA 的肽酰基转移到A-位以后,空载的tRNA立即退出P-位。eEF-2和GTP 负责把A-位新形成的肽酰-tRNA 转移到空出来的P-位上。eEF-2所需的GTP,水解成GDP。经过这需eEF-2和GTP 的转位作用,肽酰-tRNA 转移到P-位,A-位空出,等待下轮氨酰-tRNA 识别和进行肽链的再延伸。

### 四、肽链合成的终止和肽的释放

在原核细胞中肽链的终止 包括两个步骤: 即对 mRNA 终止信号的识别 和已完成肽酰-tRNA 的水解及肽的释放。

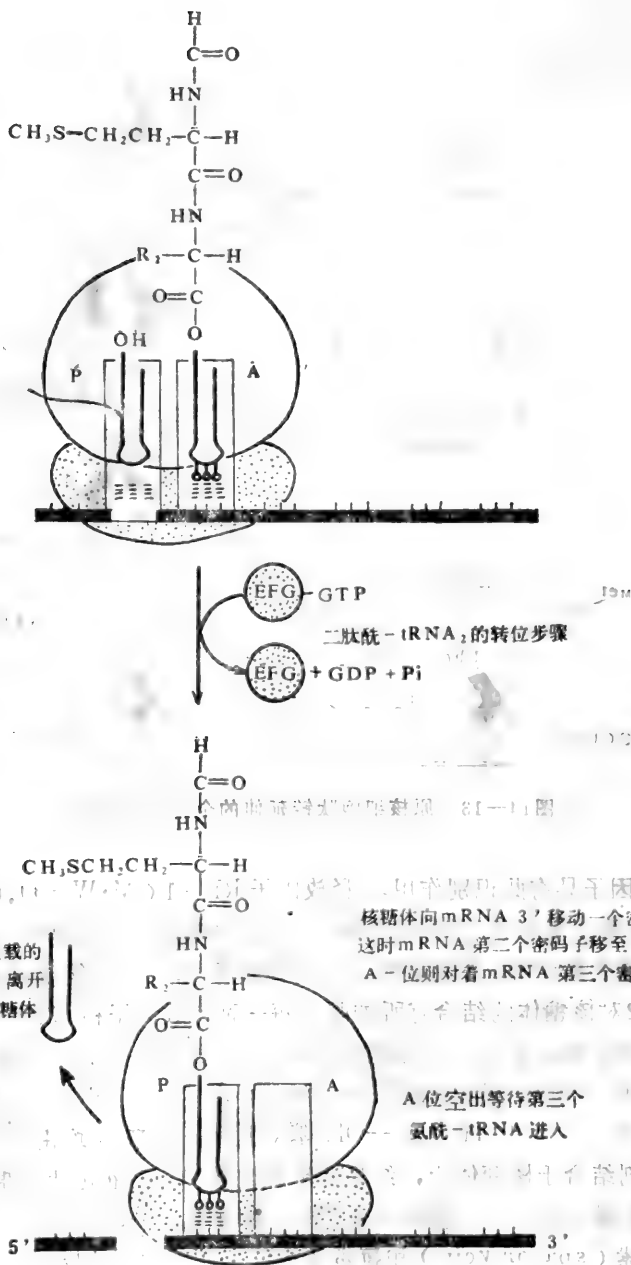


图15-12 肽链延伸中的转位步骤

核糖体向 mRNA 3'-端移动一个密码子，需要消耗能量，能量是由结合于 EF-G 上的 GTP 水解供给。这时二肽酰-tRNA<sub>2</sub> 处于 P 位，A 位空出留得第三个氨酰-tRNA<sub>3</sub> 进入。

当多周期的肽链延伸反应告终时，mRNA 上的终止密码子就会出现在 70S 核糖体的 A 一位上。没有一个 tRNA 能识别这些终止密码子。但释放因子能识别这些位于 A 一位的终止

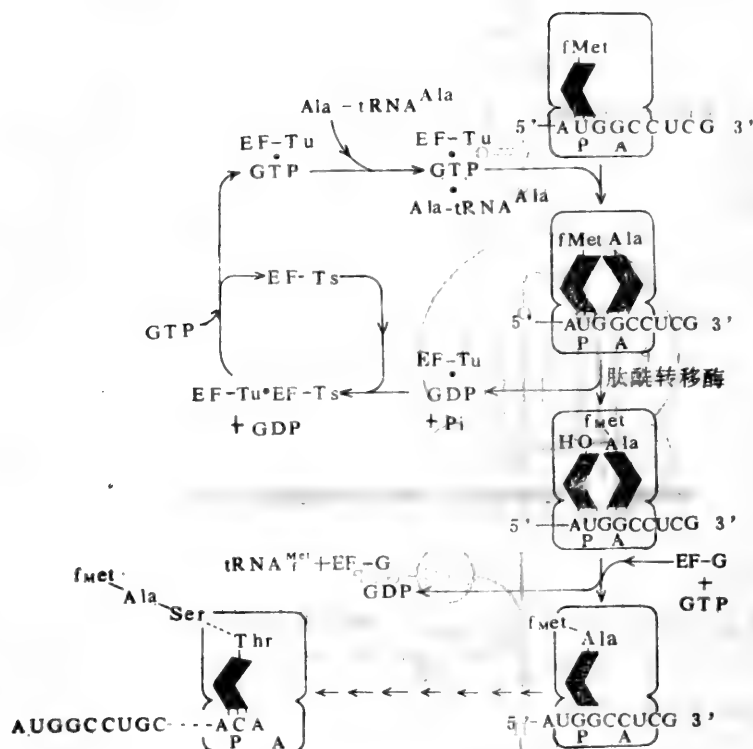
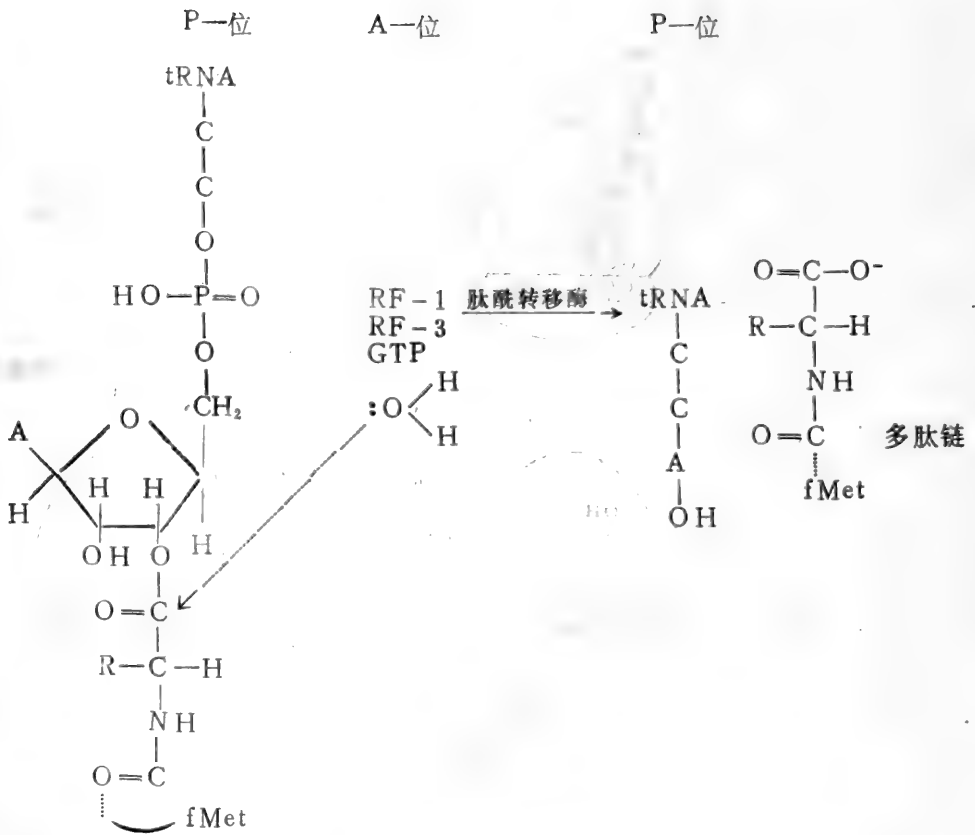


图14-13 原核细胞肽链延伸的全过程示意图

信号。有三种释放因子具有此识别作用。释放因子 RF-1 ( $M \cdot W = 44,000$  道尔顿) 能识别 UAA 和 UAG 两个终止密码子。RF-2 ( $M \cdot W = 47,000$  道尔顿) 则识别 UAA 和 UGA 两个终止密码子。RF-3 在其它因子不存在时, 没有释放活性, 它的功能就目前所知是结合 GTP, 使 RF-1 和 RF-2 对核糖体的结合有所加强。每一种释放因子和 GTP 结合形成复合物后, 复该合物即结合于终止密码子上, 从而改变肽酰转移酶的专一性, 这时它专一地催化结合于 P 一位的肽酰基与  $H_2O$  反应。就象该酶在肽链延伸步骤中催化  $-NH_2$  对肽酰基的亲核攻击, 而在肽链终止步骤中, 它催化  $H_2O$  的  $-OH$  基对肽酰基的亲核攻击。有人用醇代替氨酰-tRNA 作为亲核剂结合于核糖体上, 结果发现肽酰转移酶会催化肽酰酯的形成。所以水解作用和转肽作用可能属一类反应, 都是一个亲核基团在肽酰-tRNA 上的亲核取代反应。一些抗菌素如稀疏霉素 (sparomycin) 和氯霉素等能抑制肽酰转移反应, 也能在体外抑制肽链的终止反应, 证实了这一设想。该酶催化肽链释放的反应见 633 页页首。

肽链水解释放后, mRNA 和空载 tRNA 仍然结合在核糖体上。它们的除去需要 EF-G、GTP 和另一个释放因子 RF-3 ( $M \cdot W = 18,000$  道尔顿)。EF-G 的作用是排斥脱酰后的空载 tRNA。

核糖体可以 70S 和 50S 形式释放。一般认为它先是释放 70S, 然后由抗结合因子 IF-3 使 50S 离开 30S-IF-3 复合物。所以在一般情况, 当肽链合成告终时, 核糖体解离为 30S



和 50S 亚基。但当 30S 量远远超过 IF-3 时，则会有 70S 累积。70S 和 30S 及 50S 间一般有一平衡，IF-1 加速这一平衡的形成。如果 IF-3 过量，则阻止 30S 和 50S 亚基重新结合，这时 IF-1 则促进其解离。原核肽链终止示意图 14-14。

关于真核细胞中肽链终止，目前所知甚少。但释放因子已从几种系统中纯化，它似乎能识别 UAA、UGA 和 UAG 三种终止密码子，但也需要 GTP 水解成 GDP + Pi。令人惊讶的是，在体外系统释放需要 UAAA、UAGA、UGAA 和 UAGG 等四核苷酸存在。

### 五、通过多核糖体形式加速 mRNA 的翻译

每个核糖体可以独立地完成一条肽链的合成，但从胰脏等蛋白质合成很活跃的组织中小心分离核糖体时，会发现几个或几十个核糖体常成串地排列着。一般当一条肽链延伸到 25 个氨基酸左右，编码 mRNA 分子的 AUG 起始部位即与核糖体毫无连系。这时第二个起始复合物即形成。两个 70S 核糖体以相等速度沿 mRNA 链移动。同样第二条肽链达一定长度后，第三个起始复合物即形成。这种移动和再起始过程可继续进行下去，直至 mRNA 链上都以 80 个核苷酸的距离被一个个核糖体结合的密度覆盖起来为止。这种大的翻译单位称为多核糖体 (polysome)。这是所有细胞中翻译单位的普遍形式。用核糖核酸酶作用于此多核糖体，可获得许多单个的核糖体碎片。所以每个多核糖体间的 mRNA 链都是单股 RNA。从电镜中也可看到核糖体间的连线 (单股 RNA) (见图 14-15a) 这个大翻译单位的翻译

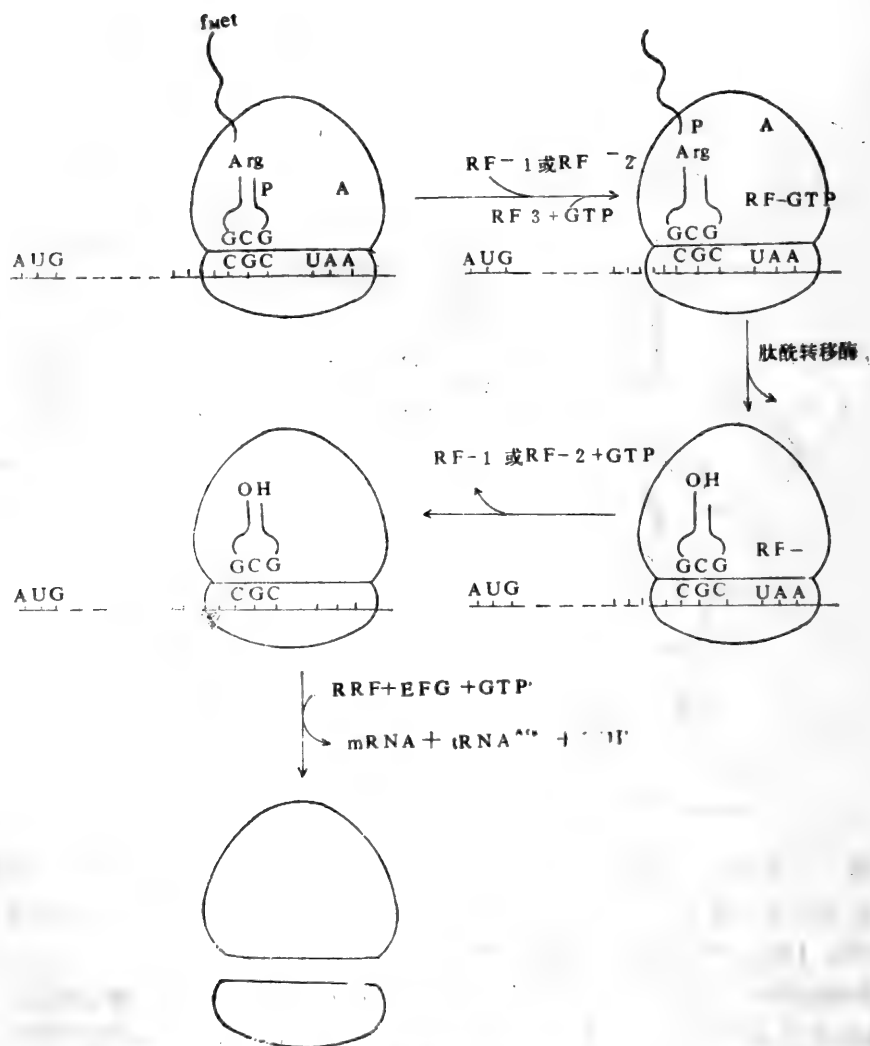


图14-14 原核细胞中肽链终止图

示意图见图14-15b。也就是说在同一mRNA链上可同时进行多条肽链的合成。由于各核糖体间距离不远，只80个核苷酸，因而这样就大大提高了mRNA链的翻译效率。

有些多核糖体只含有5-6核糖体，如网质红细胞多核糖体。而有些可多达几十个核糖体，如肌球蛋白的重链含1800个氨基酸。其多核糖体中常可多达60个核糖体成串排列着。

电镜观察到多核糖体还具有三维结构。六个以上的核糖体成串排列而成的多核糖体：具有坚固的螺旋状结构，其小亚基面向螺旋内侧（如图14-16）。

在细菌中转录和翻译是紧紧偶联着的。因为正在被转录的mRNA具有自由5'一端，而mRNA翻译蛋白质即从其5'一端起始。因在细菌中没有核膜把DNA和核糖体分开，所以在mRNA尚未转录完成并从DNA上释放时，核糖体即可在其5'一端起始蛋白质的翻译工作。同时细菌的mRNA寿命很短，很易为核酸酶水解。因此一给定蛋白质或一组给定蛋白质的

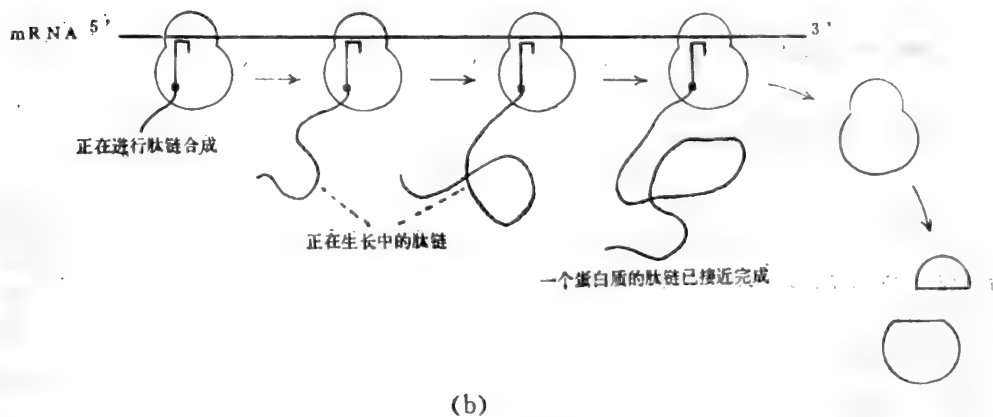
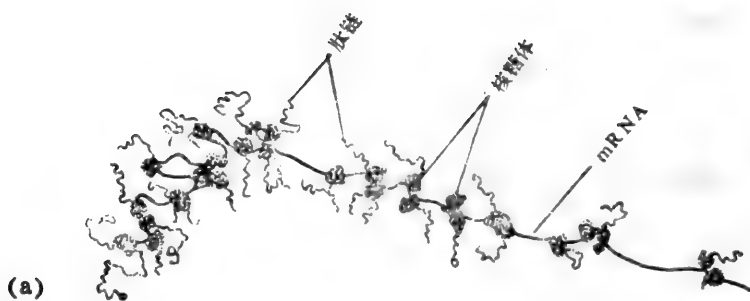


图14-15 多核糖体翻译蛋白质

(a)电镜照片描图，说明 mRNA 正在被许多核糖体翻译。随着核糖体由 mRNA 5'一端向3'一端移动，肽链愈来愈伸长；(b)五个核糖体在 mRNA 链上同时由5'一端向3'一端移动，并翻译 mRNA 的示意图。

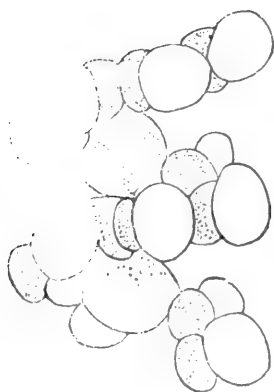


图14-16 多核糖体的三维螺旋结构  
为小亚基。

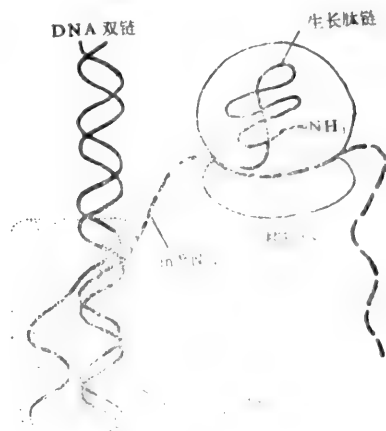


图14-17 细菌的偶联转录翻译示意图

mRNA 只有采取这种偶联形式和多核糖体的大结构单位，才能确保蛋白质以高效恒速进行合成。偶联转录和翻译示如图14—17。

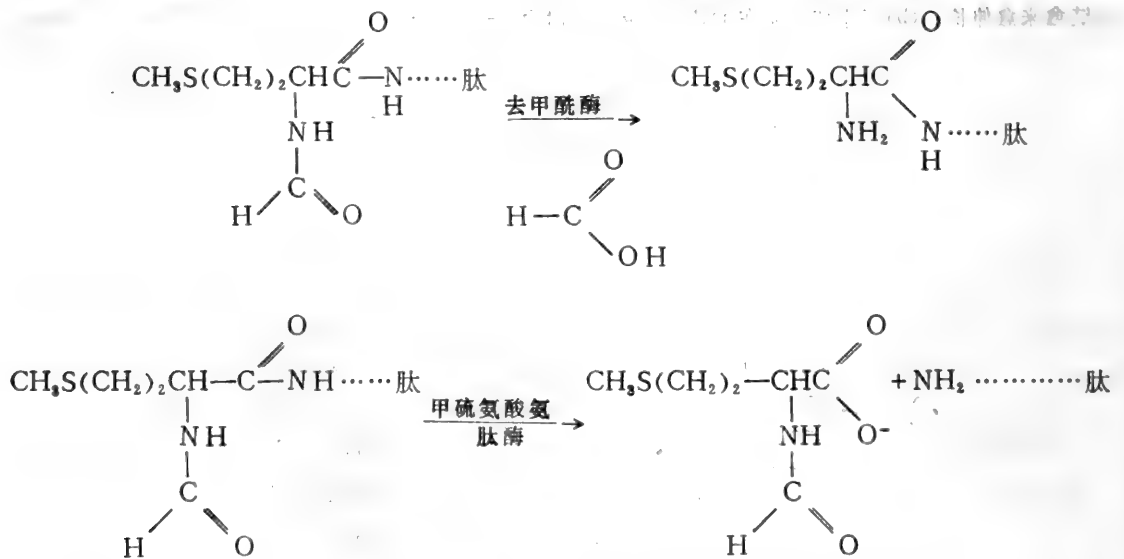
## 第五节 构白质生物合成后的后加工

蛋白质肽链从核糖体上释放后，必需经过若干后加工处理，才能成为成熟的有一定生理功能的蛋白质分子。必需经后加工才能成为有功能蛋白质的一种措施可能是细胞代谢调节的一种方式。

### 一、蛋白质的后加工方式

#### (一) N—端除去甲酰基或 $\text{H}-\text{C}(=\text{O})-\text{Met}$ 基

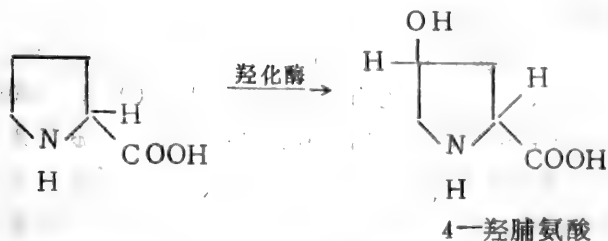
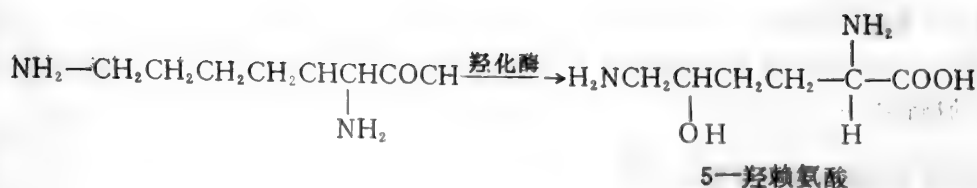
在原核细胞中从未发现过以 fMet 为 N—端氨基酸的蛋白质。大约蛋白质在去甲酰酶催化下，除去甲酰基，而使 Met 留作 N—端氨基酸。在原核和真核细胞中，从核糖体释放的蛋白质常常要除去 fMet 或 Met，也可能除去少数几个氨基酸才能成熟，此反应由氨肽酶催化水解。这个水解反应有时在肽链正在延伸时发生，有时则在肽链从核糖体释放后发生。原核细胞究竟采取去甲酰基还是去 fMet，常决定于邻近氨基酸的本性。如果第二个氨基酸为 Arg、Asn、Asp、Glu、Ile 或 Lys，则以去甲酰作用为主，如果第二个氨基酸为 Ala、Gly、Pro、Thr 或 Val，则通常都是去 fMet。去甲酰基或去 fMet 的反应如下：



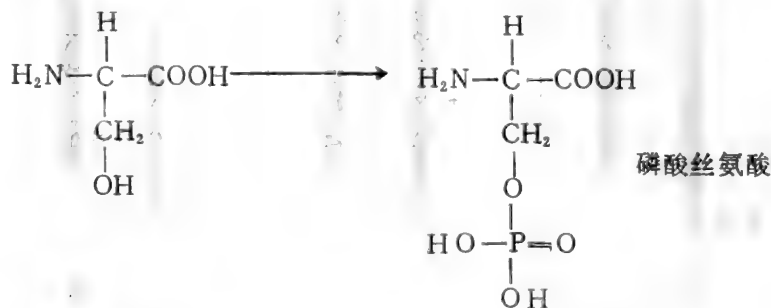
#### (二) 蛋白质上一些氨基酸被修饰

有些氨基酸没有相应的遗传密码子。而是在肽链从核糖体释放后经修饰而成。如胶原蛋白中有大量的羟脯氨酸和羟赖氨酸，是 Pro 和 Lys 经羟化而成。



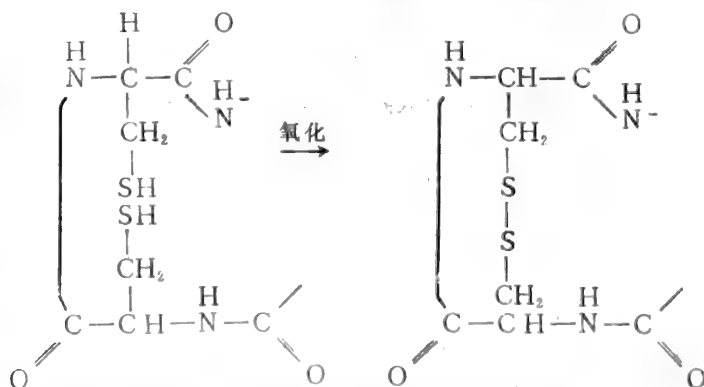


许多有机体的Ser、Tyr和Trp可发生磷酸化。如Ser磷酸化成为磷酸丝氨酸。也有一些蛋白质中的Ser和Thr—OH可与糖结合形成糖蛋白。最后还有一些辅基如血红素和生物素等可共价结合于一些酶蛋白上。



### (三) 蛋白质上某氨基酸的氧化加工

许多蛋白质中的半胱氨酸可氧化而成链内或链间二硫键。如



### (四) 除去一段前导序列，或把后随肽段中间某肽链切断

许多酶原激活和激素前体的后加工成为有功能的酶和激素，即属于此。如胰凝乳蛋白酶原从两个不同部位切去四个氨基酸而成为有消化活性的胰凝乳蛋白酶（见酶一章）。另外用

脊髓灰质炎病毒 (Poliovirus) 感染后的细胞中所合成的一个大蛋白质前体, 可在几个部位切割而成为不同的活性蛋白, 因而这前体又称为聚蛋白质 (Polyprotein)。许多聚蛋白实例见于动物病毒中。

二、蛋白质翻译后的后加工实例

(一)前胰岛素后加工成胰岛素的过程

胰岛素象其它分泌蛋白质一样, 是在胰脏  $\beta$ -细胞中内质网的核糖体上合成的。用不均一的无细胞系统翻译胰岛中的 mRNA, 其初始产物为一个  $M \cdot W = 14,000 - 18,000$  道尔顿的大肽, 称为初前胰岛素。而最终的稳定核糖体合成产物为前胰岛素。猪的前胰岛素含有一个单肽链, N-一端区序列为胰岛素的B链。接着B链C-一端的是33个氨基酸的多肽, 称C-肽, 它和胰岛素A链 N-一端相连。前胰岛素加工成胰岛素是在高尔基体或分泌颗粒中进行的是一

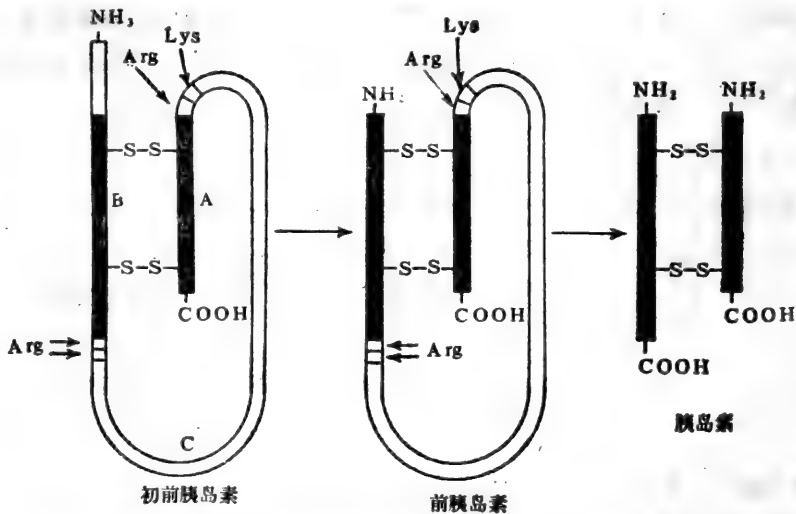


图14—18 在活体内初前胰岛素经前胰岛素被加工成胰岛素的过程

种蛋白质水解反应。在酶解时, C-肽两端各除去两个氨基酸, 即 Arg31、Arg32和Lys62、Arg63。自由 C-肽保持在分泌颗粒上, 与成熟胰岛素以等克分子分泌。初前胰岛素加工成胰岛素过程见图14—18。

(二)胶原的生物合成及翻译后的后加工

胶原是胞外蛋白, 但它最初在胞内以一前体分子被合成。该前体分子在成为成熟胶原以前, 必需进行后加工。胶原前体象其它分泌蛋白一样, 当它在胞外出现前, 必须经内质网和高尔基复合体加工。

早期的胶原前体, 是初前胶原 (Preprocollagen), 其 N-一端约有100 个氨基酸的前导序列, 它由结合在内质网上的核糖体所产生。随着前导序列插入内质网泡状空间 (Vesicular Space), 前导序列即被切去成为前胶原 (Procollagen)。前胶原 N-一端继续伸入内质网网状间隙, 在那儿脯氨酰-4-羟化酶和赖氨酰-5-羟化酶作用于  $[(Gly-X-Y)_n]$  多肽Y部位的 Pro或 Lys, 使之修饰成4-羟脯氨酸或5-羟赖氨酸。另有一个脯氨酸-3-羟化酶, 使 X部位

的 Pro 成为 3-羟脯氨酸, 这个 3-羟脯氨酸刚好位于 4-羟脯氨酸之前。最后由一糖苷转移酶把葡萄糖或半乳糖苷基转移到羟赖氨酸的  $-OH$  上。

前胶原分子 N 一端有  $M \cdot W = 20,000$  道尔顿的多余肽段, C 一端有  $M \cdot W = 30,000 - 35,000$  道尔顿的多余肽段。这两个肽段都含 CysH, 经氧化, N 一端多余肽段只形成链内二硫键, 而 C 一端多余肽段则既形成链内又形成链间二硫键。前胶原分子以三股螺旋集合。

含有重复结构  $(Gly-X-Y)_n$  的胶原前体在细胞内的后加工次序是:

1. 除去前导信号序列
2. Y 一位脯氨酸残基 4-羟基化
3. Y 一位赖氨酸残基 5-羟基化
4. 当 Y 一位为 4-羟脯氨酸残基时, X 一位脯氨酸残基的 3-羟基化
5. 羟赖氨酸残基的糖基化
6. 形成链内和链间二硫键
7. 形成前胶原三股螺旋

前胶原在细胞内后加工后, 糖基化的前胶原经由高尔基复合体到达细胞外, 在细胞外前胶原经氨肽酶和羧肽酶催化除去 N 一端和 C 一端的多余肽段, 成为约含 1000 个氨基酸的胶原分子, 它们可自动聚合成胶原纤维。

## 第十五章 核酸和蛋白质合成的调控

活细胞都具有准确编制程序的机制，以调节其不同蛋白质的合成。任何细胞都不是连续地合成它能够合成的蛋白质，每个细胞中每一种蛋白质都有固定数目的拷贝数来流畅地高效地进行各种代谢活动。例如 *E. Coli* 细胞含有约3,000个以上为不同蛋白质编码的基因，但这3,000种蛋白并不是以等拷贝存在，它们在菌体中的数目相差甚为悬殊。有些数目比较恒定，有些则随环境的变化而变化。如酵解途径中的酶在数目上比较恒定，而且每个细胞中的拷贝数也很多；半乳糖苷酶通常只有几个拷贝，而随环境中某营养成分的增加其拷贝数可急剧增加。酶合成的调节，使每类细胞带有合适的酶群来维持其正常的细胞功能，也使细菌能经济地利用氨基酸来合成那些用量少而又偶然利用的酶。

在高等生物中，蛋白质合成的调控更为复杂。脊椎动物每个细胞虽含有有机体的整个基因组，但任何一种细胞却只有一部分基因能够表达。几乎所有高等动物细胞都含有中心代谢途径所需的基本酶系，而不同的细胞如肌肉、肝、脑等却各具有其特殊的结构和功能，这些特殊的结构和功能又都是由一组专一性蛋白质所决定。如骨肌细胞含有大量定向的肌球蛋白和肌动蛋白丝，而肝细胞中这类蛋白质的含量则很少；脑细胞中含有许多制造各种神经递质的酶，而肝细胞中则没有这类酶；同样，哺乳类肝细胞中含有合成尿素的酶系，而其它组织则没有或含量极少。此外，高等生物有次序的分化和生长期间，不同专一性蛋白质的生物合成都必须有准确的时序和准确的表现次序。

从以上一些事实可以断言：生物体必有某种机制来选择性地利用基因组，以合成应付各种细胞需要的蛋白质。这些基因功能的调节又是如何进行才能确保需要，这是当今最重要而且最热门的研究课题之一。上一章已经讲过，蛋白质的确切合成是 mRNA 翻译的结果，这是基因表达总过程的最后一步。其起始步骤则是从 DNA 的特殊区域或特殊基因转录 RNA，而转录和翻译两个过程又受各种调节分子调节机制的支配。这些调节机制有效地影响细胞内每一特殊蛋白质的水平。现分别介绍这些调控机制。

### 第一节 转录的调控

细胞内有一大类分子机制来调节 RNA 的转录。

#### 一、RNA链的起始及其调节

在37℃，*E. Coli* 中 RNA 链的生长速度约为每秒4—50个核苷酸。这速度常随温度及其它环境而变。在正常条件下，RNA 的生成量似乎不受 RNA 链生长速度的影响，而是受 RNA 链起始速度的影响。不同的 RNA 分子，这种起始速度相差颇为悬殊。例如需要量很大的 rRNA 分子，在 *E. Coli* 中能以每秒一分子的速度起始；而编码那些只少量存在的蛋

白质的 RNA, 每个细菌周期才偶尔起始转录一次。一个 RNA 的转录一旦起始, RNA 聚合酶即从启动子部位转移, 以转录邻近的基因, 把起始部位空出来留给第二个 RNA 聚合酶分子, 这起始频率将决定在某基因组序列上 RNA 聚合酶分子间的距离。

(一) 操纵子 (operon) 和调节分子 (regulatory molecules)

在细菌细胞中, 在功能上有关的一组基因常作为一个单位被调节和转录, 这一个单位就称为一个操纵子 (如图15—1)。一个操纵子被转录后得到一个多顺反子 mRNA, 从而翻译

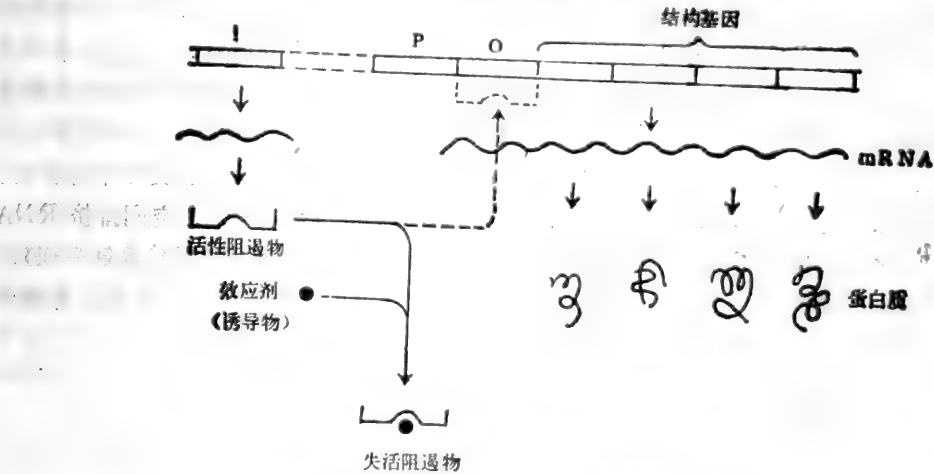


图15—1 一个可诱导的负调节操纵子

成不同的蛋白质。从图15—1可以看出: 每个操纵子只有一个启动子部位。RNA 聚合酶在起始转录之前首先结合在那里。在启动基因与结构基因之间有一调节区用来调节 RNA 聚合酶转录该操纵子的频率。

调节区有两种类型: 其中一种上有一操纵基因序列覆盖启动基因上的 RNA 聚合酶结合部位。在正常状态下这个区是打开的, RNA 聚合酶分子可以高频率通过该区进行转录, 可通过逐渐关闭来调节这频率。另一类型的调节区有一个起始基因区 (initiator gene region), 这个区在正常状态是关闭的, 因而限制 RNA 聚合酶通过, 并可通过逐渐打开而调节其通过频率。除两个调节区外, 改变频率的机制是 RNA 聚合酶能转录包含一个专一性调节蛋白的操纵子。对每个操纵子来说, 这调节蛋白通常是一个专一性的小分子。

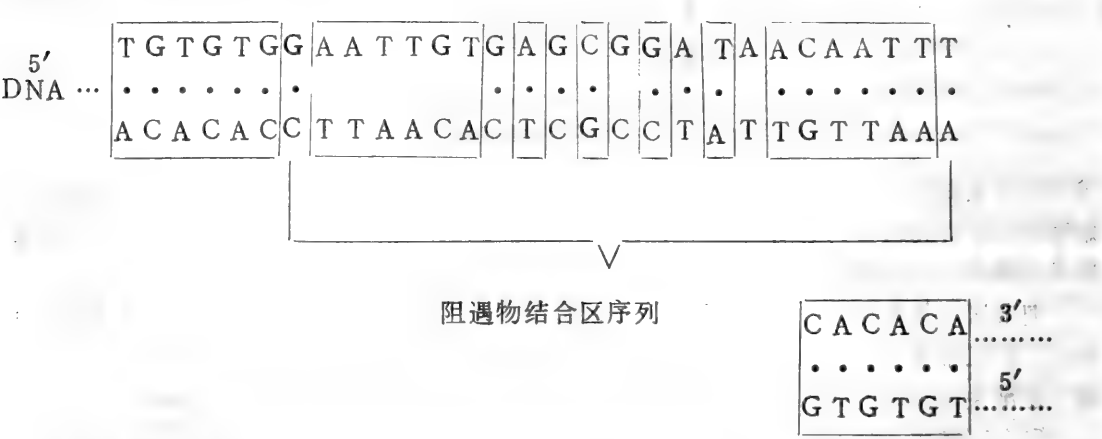
大多数调节蛋白质是双功能的。它既能与基因组中专一性部位作用, 从而影响邻近基因的转录, 又能与一小分子物质作用。一个操纵基因的调节蛋白称为阻遏物 (repressor)。而活化物 (activator) 则是结合于起始基因上的调节蛋白, 它又称正活化物 (positive activator)。在阻遏操纵子中, 调节蛋白本身无阻遏活性, 称为阻遏物蛋白 (aporepressor), 只有当它结合一个适当小分子物质后才显示阻遏活性。此小分子物质称为辅阻遏物, 它通常是生物合成途径的终产物或与终产物有密切关系的分子。在诱导操纵子中, 调节蛋白是一个活性阻遏物 (active repressor), 当一个诱导物 (inducer) 或效应剂 (effector) 的小分子结合于此活性阻遏物后, 该阻遏物就不再与操纵基因上原有部位结合, 而离开操纵基因, 导致 RNA 聚合酶得以转录 (图15—1即此例), 这是一个负调节操纵子。如果小分子诱导物结合于活性阻遏物后, 即赋与此活性阻遏物以新的功能, 使它能结合于起始基因

上,即使该阻遏物转变成一个起始因子,这是一个正调节操纵子。活性阻遏物的诱导物,通常是分解代谢途径中的底物或与该底物密切相关的分子。

(二) 诱导作用 (Induction)

图15—1是代表一个负调节诱导系统的示意图。其中包括：一个为阻遏物编码的调节基因(i)；一个启动子区(P)；一个操纵基因区(O)；若干个结构基因区。它们构成了一个完整操纵子。

研究得最深入的操纵子是大肠杆菌的乳糖操纵子 (Lac operon)。当培养基中只有乳糖存在而无其它碳源时,乳糖进入该菌细胞中,并转变为别乳糖 (allolactose),这个小分子即乳糖操纵子的诱导物,可诱导细胞内乳糖分解酶系的合成。乳糖操纵子的调节基因区转录并翻译乳糖阻遏物。该阻遏物是一个四聚体蛋白 (M·W为150,000道尔顿),它可结合在乳糖操纵基因区一个约25b. p的乳糖操纵基因部位 (Lac—operator site)。当乳糖不存在时,这种结合具有高亲和力,它把启动子上的 RNA 聚合酶结合部位覆盖起来,在空间排挤 RNA 聚合酶分子,使之脱离启动子部位。这个操纵基因区含有大的回纹结构(即倒转重复序列),这是 Lac—阻遏物的识别和结合序列,如下式所示,这个序列中任何部位产生突变,阻遏物将不再与之结合。

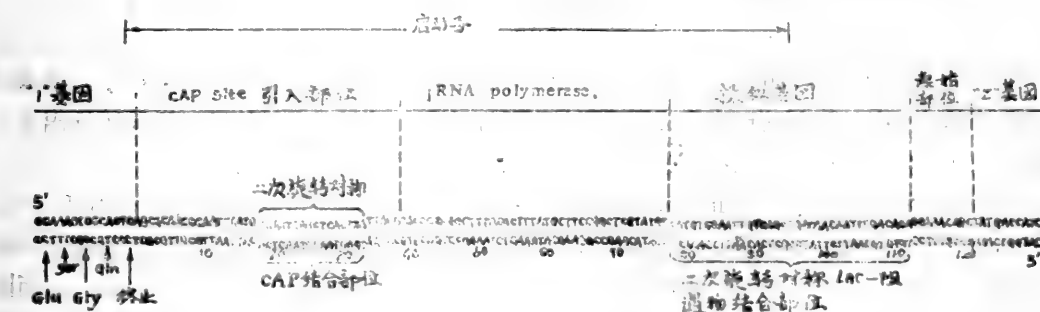


当培养基中不存在其它碳源而只存在乳糖时,别乳糖与 Lac—阻遏物上一个专一性部位结合 (诱导部位) 形成诱导物——阻遏物复合物,这样就降低了 Lac—阻遏物对 DNA 操纵基因部位的亲和力,从而使 Lac—阻遏物离开操纵基因区。Lac—阻遏物一旦离开操纵基因区, RNA 聚合酶即可重新结合到操纵基因区,从那儿的起始部位起始转录,并移行进入三个结构基因区,转录出三个结构基因的 mRNA,从而翻译成三个用于乳糖代谢的蛋白质。

Lac—阻遏物已于1967年分离纯化,它确有诱导物和 DNA 两个专一性结合部位。当诱导物部位未被占据时,它对 DNA 上专一性部位结合非常紧密,其亲和力很高。当阻遏物浓度为 $10^{-13}$  时,即可使最大值的一半结合于操纵基因部位。

另外,在乳糖操纵子上的启动子部位,还顺序地存在两个专一性区域,各有其明显功能。靠近操纵基因区那一边是 RNA 聚合酶的进入部位, RNA 聚合酶与 DNA 结合首先从那儿开始;靠近调节基因区的则是另一个调节蛋白结合区,又称为分解代谢活化剂蛋白 [Catabolite activator protein (CAP)] 结合区,这个区域也是用以调节 RNA—聚合酶转录活性

的。当培养基中葡萄糖缺乏，CAP 即与 cAMP 结合形成复合物，它可结合于启动子部位上的 CAP 结合区，从而使 RNA 聚合酶进入 RNA-聚合酶 结合区。这时如果培养基中有乳糖存在，则 Lac-阻遏物必已离开操纵基因区，即操纵基因区是打开的。那么 RNA 聚合酶就可从其进入部位顺利地经操纵基因区移行到结构基因区，转录三个结构基因。如果这时也有葡萄糖存在，则 cAMP 浓度很低，CAP-cAMP 复合物就不能形成。单独的 CAP 不能结合到启动子上的 CAP 结合区，因而 RNA 聚合酶也就不能进入启动子区。这时，即使培养基中有乳糖存在而使乳糖操纵基因区打开，但由于 RNA 聚合酶不能结合于启动子上，三个结构基因也不能被转录。这是与上述阻遏物调节相协调的另一种调节机制，它是大肠菌感知葡萄糖是否存在的一种调节方式。

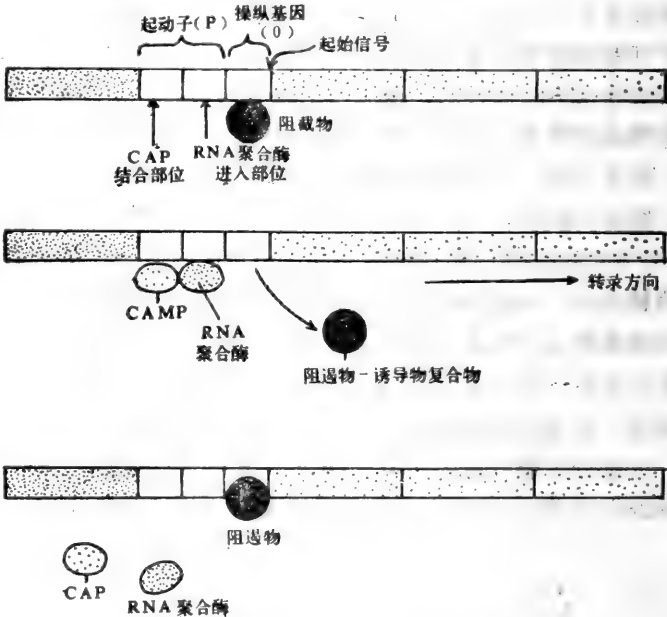


它前面有调节基因,后面为结构基因。启动子和操纵基因间有一段重叠。括弧中的序列为cAMP-CAP结合部位中的倒转重复序列。被各种蛋白质保护免受DNase消化的各区域亦表示于图中。图中也示出了因启动子突变而得一不活泼启动子(下降)、一个特活泼启动子和不依赖于cAMP-CAP的启动子(上升)的情况。

为细菌提供碳源。在结构基因的邻近是一复杂的启动子区和一调节基因 AraC 区。AraC 编码一个 AraC-调节蛋白。该蛋白有双重功能，既可作为正调节因子，又可作为负调节因子，这一点与 Lac-阻遏蛋白不同。另一个不同点是 Ara B、A、D 基因群和 AraC 基因的转录方向相反，而且利用不同的 DNA 股为模板进行转录，AraB、A、D 由启动子 PBAD 向左转录，而 AraC 则由其启动子 PC 向右转录。

图15-3 Lac—操纵子的阻遏及诱导图

- (a) Lac—操纵子的调控区；
- (b) 表示有乳糖存在，葡萄糖不存在时三个结构基因可被转录；
- (c) 有葡萄糖存在时 cAMP 浓度很低，CAP—cAMP 不能形成，RNA—聚合酶不能到其结合部位，而阻遏物则结合在操纵基因上，三个结构基因不能被转录。



阿拉伯糖操纵子是可诱导的，其诱导物为阿拉伯糖本身。只有在阿拉伯存在下，该操纵子才能转录出 mRNA 而翻译成相应的酶。在葡萄糖存在下，该 mRNA 不能被转录出来，说明从 PBAD 转录 mRNA 也需要 cAMP—CAP。

AraC 调节蛋白是怎样起正负调节作用的呢？AraC 蛋白可以两种构象状态（Pr 和 Pi）相平衡而存在。当培养其中不存在阿拉糖时，Pr 占优势，这时它是一个活性阻遏物，可结合于操纵子上的一个类似操纵基因的部位，从而阻碍 RNA—聚合酶与启动子结合，因而阻止了三了结构基因的转录。当有阿拉伯糖存在时，阿拉伯糖与 AraC 蛋白结合并使 Pi 形式稳定，而已被结合的 Pr 型 AraC 由于阿拉糖的结合旋即的离开操纵子上的结合部位成为 Pi 型，这时它作为一个 起始因子结合于启动子上的起始部位，使 RNA—聚合酶起始转录。所以

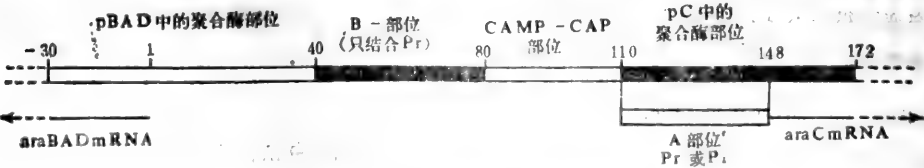


图15-4 阿拉糖操纵子的调节区

Pr 或 Pi 为 AraC 蛋白的两种形式。I 为结构基因转录 mRNA 的起始部位，PC 为 AraC 的启动子部位。



AraC 蛋白的 Pr 起负调节作用，而 Pi 起正调节作用（诱导作用）。关于阿拉伯糖操纵子的调节部位的排列如图15—4

培养基中的营养成分对 Ara—操纵子的转录亦起调节作用，即 Ara—操纵子的表达也必须有 CAP—cAMP 的调控，以感知葡萄糖是否存在。作用示如图15—5。

图中(a) 是当葡萄糖存在 而阿拉伯糖不存在时， 结构基因的启动子 区无 cAMP—CAP 结合。因无阿拉伯糖，故 AraC 以 Pr 形式 存在，并占据 AraC 的起动机部 位。所以转录AraC 的RNA—聚合酶 (RNA-P)不能结合 于其启动子区，生成的 AraC 很少。

图中(b) 是当葡萄糖和阿拉 糖都不存在 时，cAMP—CAP形成，并占据了 它在操纵子上的结合部位。Pr 仍然 使 AraC 保持低浓度，但由于它不能 很好地与 RNA—聚合酶竞争，以产 生更多的 AraC 蛋白，所以 除非有 其它碳源，否则葡萄糖饥饿细胞是不 能生长的。图中(c)为葡萄糖不 存在 而阿拉伯糖存在时，Pr转变为 Pi， 它与 RNA 聚合竞争 AraC 基因的起 动机部位，使 RNA 聚合酶 离开 该 起动机，以免过多 地合成 AraC m RNA，造成浪费。而 Pi 则可结合于 结构基因的起始部位，同时 cAMP—CAP 由于葡萄糖不存在 而增加，故 它结合在结构基因的起动机区促进该 RNA—P 结合于该区，从而促进结构 基因的转录。在 这一情况下，Ara—操纵子处于全诱导状态，结构基因大量转录，阿拉伯糖代谢酶迅速合 成。

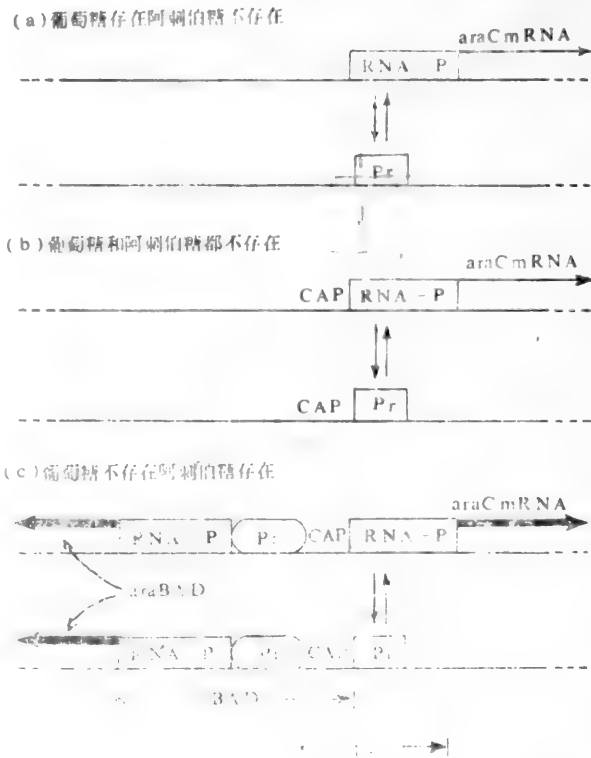


图15—5 在各种营养条件下 Ara—操纵子调节区的状态  
RNA-P 代表 RNA 聚合酶，AraBAD 代表该操纵子的结构基因区。

### (三)阻遏作用 (repression)

一个设想的负阻遏系统模型如图15—6。调节基因转录成调节 mRNA，再翻译成调节蛋白，此蛋白为一无活性的阻遏物蛋白。当它与代谢途径的终产物——一个效应剂（或辅阻遏物）结合时，即形成有活性的阻遏物，它可结合于操纵基因区，从而阻止 RNA—聚合酶起始转录。色氨酸操纵子就是采取这种方式调节的一个系统，终产物 Trp 作为辅阻遏物。因此当有外源 Trp 存在时，细胞内的 Trp 水平使 Trp——操纵子保持阻遏状态，导致色氨酸合成途径中有关酶的基因不能正常转录。而当 Trp 不存在时，活性阻遏物缺乏，操纵子即处于去阻遏状态，RNA—聚合酶可畅通无阻地进行转录。Trp—操纵子的结构示如图15

P.C.之前有一

一7。图中 TrpR 为调节基因，可转录调节 mRNA，并翻译成调节蛋白。调节蛋白无阻遏活性，当它与终产物 Trp 结合时成为活性阻遏物。该调节蛋白为一四聚体蛋白（M.W = 12,000道尔顿）。活性阻遏物能和 Trp 操纵基因(O)紧密结合，其结合常数为  $2 \times 10^{-1}M$ 。TrpL 为转录终止的调节区。

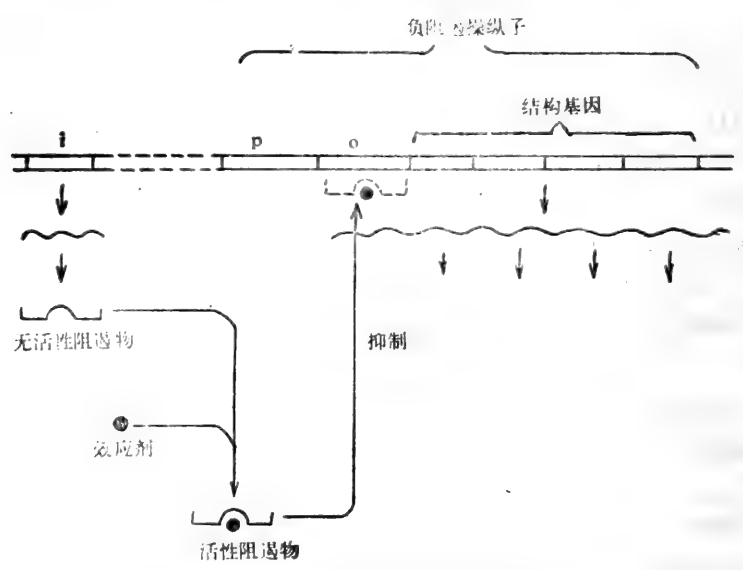


图15-6 一个设想的负阻遏系统模型

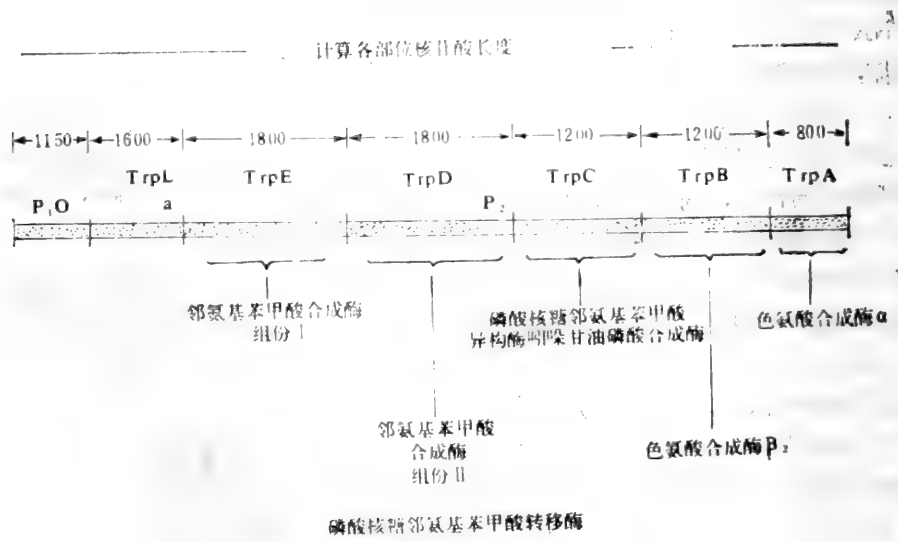


图15-7 色氨酸操纵子结构

TrpL 为前导序列，Trp E、D、C、B、A 为结构基因

Trp—操纵子的启动子—操纵基因调节区的序列如图 15-8。这个调节区较复杂，P 区

和 O 区重叠较多。O 区含倒转重复序列（20 个核苷酸中有 18 个处于对称结构中）。当 Trp 丰富活性阻遏物可以形成，它旋即结合于 Trp—操纵子 O<sub>2</sub> 区，从而阻止 RNA—聚合酶对

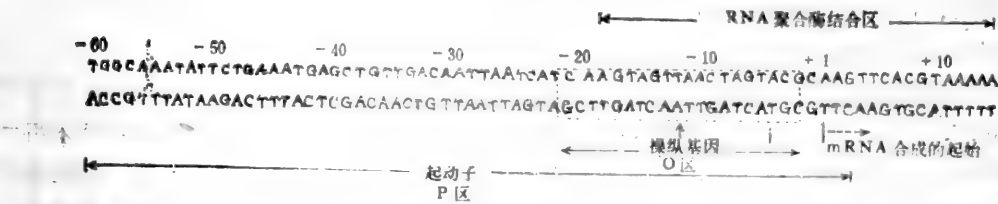


图15—8 Trp 操纵子的启动子—操纵基因调节区序列

对O区（PBS<sub>2</sub>）的专一性结合和转录。如果 RNA—聚合酶已结合在其 P 区的识别部位，再加入活性阻遏物，则不能阻止 RNA—聚合酶转录。因此阻遏物和 RNA—聚合酶 二者在P 和O 的重叠区的结合是相互竞争的。谁先结合则又决定于辅阻遏物 Trp 是否存在。这个Trp 辅阻遏物并非其本身，而是以 Trp—tRNA<sup>Trp</sup> 的形式来行使辅阻遏物作用。

（四）转录的自动调节

自动调节代表诱导和阻遏作用中的一种特殊状况，结构基因的产物可作为一个活化物或阻遏物来调节操纵子的转录。组氨酸操纵子的调节作用属于这一类。

鼠沙门氏杆菌的 His—操纵子能操纵含 10,000个核苷酸的多顺反子 mRNA 的转录。这个mRNA 可翻译成几个与组氨酸合成有关的酶。它们在操纵子上的编码顺序为：

POGDCBHAFIE

当以 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 为 N 源时，细菌能合成20种不同氨基酸。若在培养基中加入组氨酸，则菌体的组氨酸合成立即停止。这是由于 His 在 His—tRNA合成酶催化下形成His—tRNA<sup>His</sup>，它作为信号分子与无活性的阻遏蛋白结合 形成活性阻遏物，结合到操纵基因上，从而阻断

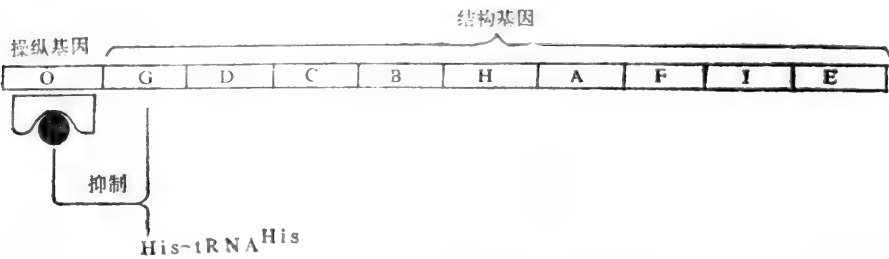


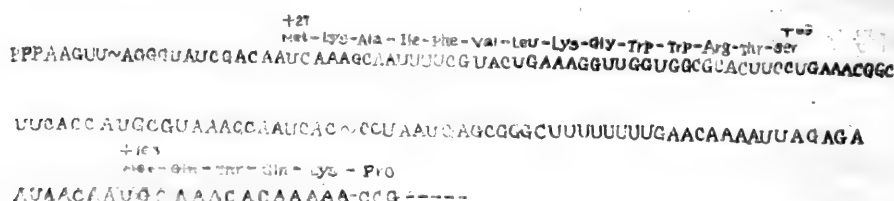
图15—9 His—操纵子的转录调节模型

RNA—聚合酶对与组氨酸合成有关酶的结构基因的转录。合成组氨酸有关酶的合 成立即停止，因而组氨酸的合成即停止。但 His—操纵子不象上面所介绍的一些操纵子，它没有一个产生专一性调节蛋白的基因。经多年研究了解到：该操纵子的第一个结构基因的产物——ATP—磷酸核糖转移酶充当了调节蛋白，它与信号分子 His—tRNA<sup>His</sup> 结合后即成 为一个

有活性的阻遏物。这阻遏物结合于操纵基因区即阻断九个结构基因的进一步转录。图15-9表示组氨酸操纵子的转录和调节。这种调节作用是一个结构基因产物充当调节蛋白，以调节多个结构基因的转录，这是一种自动调节作用。但 His<sup>-</sup>操纵子的转录也受 His-tRNA 合成酶的调节，这个酶活性的高低决定着信号分子的浓度。所以该酶也是一种调节蛋白。

上面介绍的 Lac、Trp、His—操纵子 都是在一个启动子部位起始，而以一固定方向转录—多顺反子的基因群。但有一些基因群如精氨酸基因群—Arg—ECBH 和生物素基因群—bio—ABFCD，虽然基因群上所有基因都是在等位的控制之下，但转录却不是从一端起始而是从基因群内部一个部位起始，向左右两个方向同时进行转录。如对生物素的操纵基因区和启动基因区的研究已证实所有生物素基因的转录，起始于基因群内部的一个公共调控区。

前面所介绍的 Trp—操纵子的调控，是对转录起始的一种可阻遏的负调节系统。该系统视细胞内 Trp 或 Trp—tRNA<sup>Trp</sup> 的水平高低而阻遏或进行起始转录以调节结构基因的转录水平。此外，在该操纵子中还有另一种调节转录的机制，那是通过调节转录终止来实行调节的。



该肽有两个相邻的 Trp—Trp。前导 mRNA 有明显的二级结构。对突变体的研究结果表明,“该二级结构的形成能力对调节衰减子的转录终止是至关重要的”。在前序 mRNA 3'一端似乎至少有两个发夹结构。其中一个发夹结构与转录终止子的发夹结构相似。图15—11(a)和(b)是 Trp—前导 mRNA 3'一端衰减子区段和 Trp 操纵子 Trp A 的 mRNA 3'—终端终止子区两个二级发夹结构对比。这两个发夹结构很相似。在前导序列中占优势的另一发夹结构比类终止子的发夹结构大得多。但两个发夹结构共用一个核苷酸序列,以形成其发夹茎的一半(图15—12)。所以两个发夹结构的形成是相互排斥的,不能同时形成。在正常

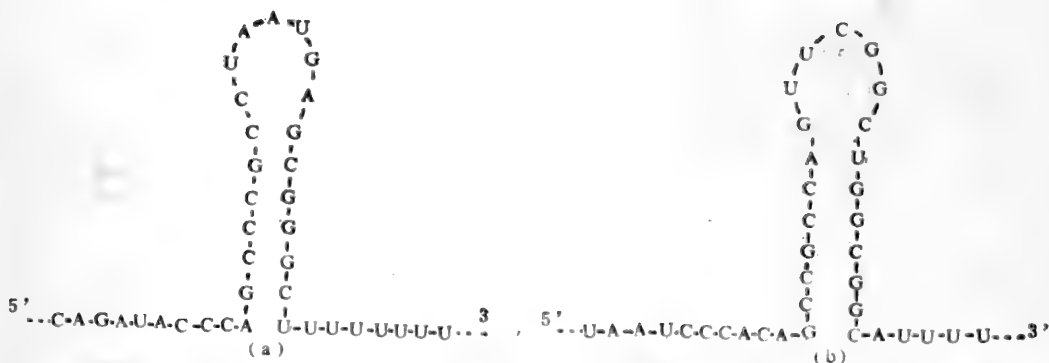


图15—11 色氨酸衰减子(a)和 Trp mRNA 终止区(b)的二级结构

条件下，色氨酸富足，核糖体在 RNA—聚合酶之后 翻译出前导序列 mRNA，并且把形成大发夹结构茎的一些核苷酸覆盖起来。但由于它停止在无意义密码子稍前一些，故不会覆盖构成类终止子的发夹结构序列，所以类终止发夹结构仍可形成，这样就会阻滞 RNA—聚合酶向前转录，使转录在前导序列终止。如图15—13(b)在缺乏色氨酸的情况下，Trp—tRNA<sup>Trp</sup>数量有限，核糖体停止在前导 mRNA 中两个相邻的色氨酸密码子处。前导序的大发夹结构不会破坏，因而类终止子发夹结构不会形成。因此 RNA—聚合酶能穿过衰减子区而进入 Trp—结构基因区，进行结构基因的转录。如图15—13(c)。

所以，Trp—操纵子的转录调节，既有调节转录起始的机构，又有调节转录终止的机构，是更为复杂的操纵子调节机构。现已有同样的模型来解释 *Salmonella Typhimurium* 中 Leu、His—操纵子的衰减作用和 *E.coli* 中 *ilv—GEDA* 操纵子的衰减作用。

在某些真核系统中也已注意到有早熟的转录终止作用。转录的衰减现象很可能也存在于真核细胞中。

### 三、通过对 RNA—聚合酶的修饰进行转录调节

在一定条件下，RNA—聚合酶可因被修饰而改变它所识别的启动子序列。从而使细胞改变其转录程序，这是转录调控的又一方式。

在细菌中  $\sigma$ -因子是引导 RNA 聚合酶识别启动子部位的决定子。如  $\sigma$ -因子遭到修饰

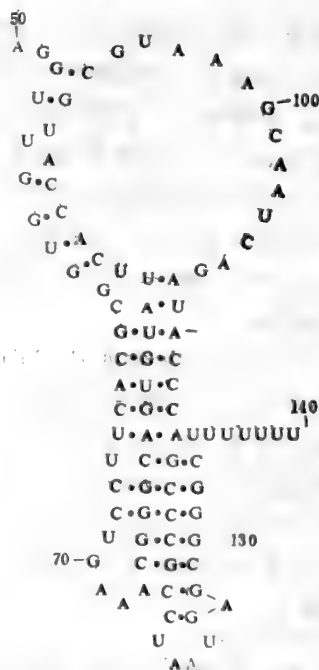


图15—12 Trp—操纵子前导序列中两发夹结构共用一个发夹茎的图形

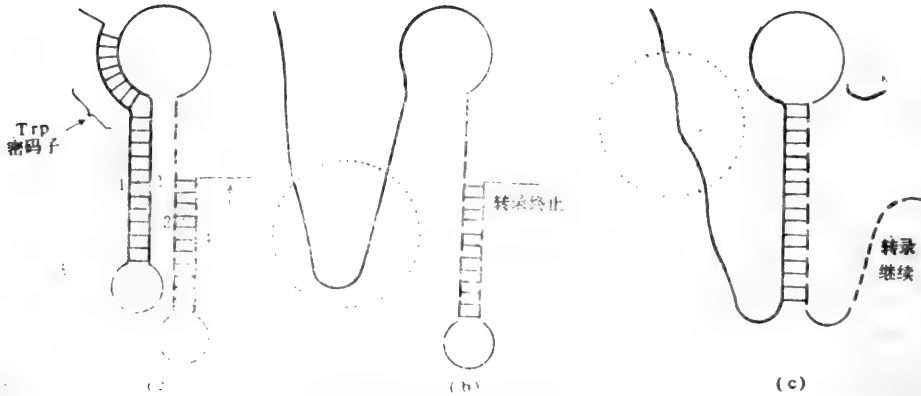


图15—13 E·Coli:Trp 操纵子的衰减子调控模型(a)为自由 mRNA, 1, 2和3, 4间形成氢键。(b)在高 Trp 浓度时核糖体已翻译达2的位置, 即把大发夹结构茎的一些核苷酸覆盖起来。终止发夹结构可形成, 转录终止。(c)在低 Trp 浓度时核糖体停止在1上, 大发夹结构不会破坏, 终止发夹结构不会形成, 转录可继续。

或取代, 则它会指挥 RNA—聚合酶去识别不同的启动子序列。噬菌体 SPOI 感染枯草杆菌期间, 就是靠这种修饰作用导致噬菌体 SPOI 基因的转录。SPOI 基因的转录分三个不同阶段。早期 SPOI 基因产物是一个类  $\sigma$ -因子的蛋白质, 它代替寄主细胞 RNA—聚合酶中的正常  $\sigma$ -因子, 这样就导致优先转录 SPOI 的中期基因。两个中期基因的产物( $P_{33}$  和  $P_{55}$ )与寄主 RNA—聚合酶结合作为另一个类型的  $\sigma$ -因子的活性复合物, 诱导 SPOI 晚期基因的专一性转录。另一方面在不适条件下, 枯草杆菌可遭受可逆变化成为孢子形成状态, 这可能也是一类  $\sigma$ -因子的指挥, 造成对启动子识别的改变, 从而造成转录方式的改变而伴生的结果。

用  $T_4$  噬菌体感染 E·Coli 期间, 寄主 RNA 合成迅速停止, 而明显地进行  $T_4$  DNA 的转录(如, 从早期到晚期 RNA 的转录)。这可能也是由于寄主 RNA—聚合酶亚基中多肽结构的改变而引起的。例如在感染四分钟内, 两个  $\alpha$ -亚基, 在  $NAD^+$  存在下被酶促修饰。这种修饰作用是  $\alpha$ -亚基上一个专一性 Arg 残基的胍基与  $NAD^+$  上的腺苷二磷酸共价结合, 使每个亚基被一个腺苷二磷酸共价修饰。此外它再结合几个噬菌体编码的蛋白质, 其中包括  $T_4$  基因33和55等的产物。这些因子可调节寄主 RNA—聚合酶的专一性, 而改变其转录过程。

#### 四、多基因(Multi-gene)的转录调控

在真核基因中, 一些基因群常以多拷贝成串的重复形式排列。组蛋白基因就是一例。在海鲐中有五种主要的组蛋白基因, 约有1000个拷贝以共线性形式的成串重复基因群排列着。图15—14是组蛋白基因的一个重复单位。在 mRNA 编码区内没有间隔序列。这五个基因, 都以同一 DNA 股作为转录 mRNA 的模板。并且在转录股上五个基因都以相同的相对3'→5'次序排列, 但在 *psammachinus miliaris* 中, 基因间的富 AT 的间隔区比 *Lytechinus*

*pictus* 中小。在 *L. pictus* 中也有两类非等位的组蛋白 基因重复单位，其形貌完全相同，但基因的间隔区在序列上不同。

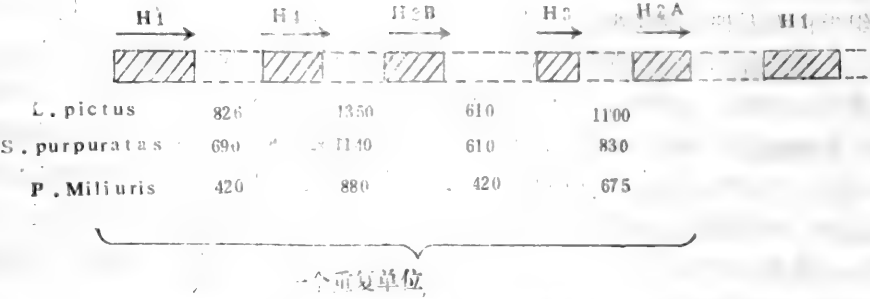


图15—14 海鲷组蛋白基因一个重复单位示意图

在 *Drosophila* 中约有100个拷贝的组蛋白基因重复单位（图15—15）。然而这些重复单位可分为两类，它们之间的差异只在于间距250bp. 的多余序列。较长重复单位的量约为较短重复单位的三倍，两类重复单位是串联排列的，较短者常在较长者的附近。这些组蛋白重复单位与海鲷不同，不完全是从同一股 DNA 转录，H4 和 H2B 从 DNA 一股转录，而 H1、H3和 H2A 则从另一股转录。

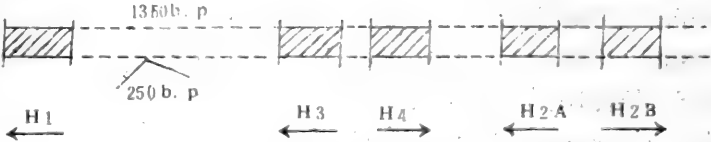


图15—15 *Dsroophila* 组蛋白基因的一个重复单位

关于组蛋白基因转录的调控，目前虽仍有争议，但一些事实是肯定的。第一是在生长细胞中组蛋白的合成与 DNA 的复制紧密偶联。第二是在 S 期，组蛋白 mRNA 活性的调节集中在转录水平上，调节机制中包含着非组蛋白作为调节分子。第三是组蛋白前体的转录后加工是关键性的调节程序，如海鲷胚中不存在高分子前体，而胚胎发育到 G-期则明显有高分子前体存在。推测组蛋白基因早期转录本的后加工比后期要快得多，可能两个时期组蛋白基因以不同方式转录和后加工。

在海鲷组蛋白编码区前后一些紧邻序列的研究中发现，各海鲷品种的这些紧邻序列不仅有同源性，而且它们都存在于形貌上相似的位置，这些保守序列似乎代表一种起始或终止信号。例如五个组蛋白 mRNA 的 5'-端紧邻序列都与基因组中一个 PyPyATTCPu t 核苷序列相一致。这个序列之前是 TA TA AA TA 序列，它处于 H2A、H2B、H3 mRNA 的 5'-端向上数约20—25个核苷酸处(H1 和 H4 在类似部位也具有类似的富 AT 区)。这个序列称为 Hogness 匣。把缺乏这个序列的海鲷 H2A 基因及其 5'- 两侧区注入海鲷卵母细胞核中，基因转录虽仍能进行，但转录生成的 mRNA 具有异常5'-端，说明 TATAAATA 区对正常转录确有调节功能。它对基因转录起着序列挑选者的作用。

海螵编码序列向下行的紧邻保守序列大多显示原核终止子或衰减子序列的性质，也显示 RNA 聚合酶Ⅱ的终止子序列的一些特性。即明显地包含一富 GC 的倒转重复序列，其后跟着一个较大的富 AT 区。

虽然组蛋白有五种主要类型。但目前已发现一些组蛋白中存在序列的非均一性。如海螵分裂早期，其组蛋白 H2A 第50位为 Met，而后期的组蛋白 H2A 50位则不是 Met。这种期专一性组蛋白的出现，是因为在不同发育期有不同组蛋白基因独特地活化结果。目前已进一步证实海螵五种组蛋白 mRNA 中的任何一种，它们在发育后期转录的产物比早期转录的产物在序列上至少有10%的差异。从而也进一步证明不同发育期被活化的组蛋白基因不同。

除海螵外，其它真核基因如免疫球蛋白可变区基因、Dictyostelium 的肌动蛋白基因都是多拷贝的，这些多拷贝之间一般都带有一些非均一序列和平均7Kb 的间隔区。它们能根据需要形成非均一的功能蛋白。

五、基因序列重排的调控

染色体是保守结构，其中的遗传信息以一定有序形式顺序地排列着。在正常情况下，这顺序是稳定的。但在重组过程中含有倒位、重复和平移等过程时，常导致非同源区的重组，也就会带来遗传信息顺序的改变。

(一) 插入序列

有一不寻常的 E. Coli 突变类群，在某操纵子中插入了一个 DNA 链段。当这个 DNA 链段整合进操纵子的一个基因中以后，不仅该基因的功能消减，也导致沿转录方向下行的所有其它基因活性降低。这样的插入元件，称为插入序列(Insertion sequence, IS)。插入序列有 IS<sub>1</sub>, IS<sub>2</sub>, IS<sub>3</sub>, IS<sub>4</sub>, IS<sub>5</sub> 等各类，它们的大小范围在800—1400 b. p. 之间，它们都是革兰氏阴性细菌的正常成分。例如 E·Coli 染色质中约有八个 IS<sub>1</sub> 拷贝、五个 IS<sub>2</sub> 拷贝，三个 IS<sub>3</sub> 拷贝和1—2个 IS<sub>4</sub> 拷贝。

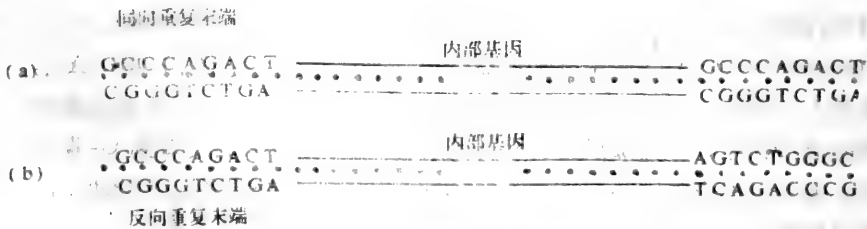


图15—16 假设的类易位子结构

(a)带有同向重复序列。(b)带有反向重复序列于其末端。

IS 的插入，显然是由于复制的错误所致，是一个无意的重组和导致依赖于 rho 因子转录终止的终止序列的重组造成的。在测定了 IS—诱导的回复突变之后，发现它是通过切除 IS 元件而产生的。虽然整合和切除所包含的酶尚未鉴定，但存在于细菌正常同源重组中的组合和切割两种活性却因突变而消失。所以证明 IS 整合和切割两种作用不会依靠已知的重组酶。IS 不仅是一个插入 DNA 片段，而且是一个可移动的 DNA 片段，它可从染色质的一个区移动到另一个区，这种移位过程称为转位或易位作用(transposition)。



易位子(Transposons(Tn))或转座子是与 IS 序列密切相关的因子，也是一段 DNA。IS 也可视为一类特殊的易位子，因它插入后在基因上产生极性，故而可被检测。而典型的细菌易位子常含有细菌可识别的基因，如抗抗菌素基因往往就是通过这些基因的转变作用而测出。可转位的抗抗菌素因素在4500b. p. (Tn1, Tn2 和 Tn3)——20000 b. p. (Tn4)范围内。目前已观察到的许多易位子，其每端都以反向或同向的相等序列彼此相邻接（图15—16）。

易位子可以从它常驻留的 R—质粒（抗药质粒）转移到其它质粒、细菌染色体和各种噬菌体上。这样的移位作用和 IS 一样在 recA 寄主中仍存在，说明它所需用的酶不依赖于正常重组作用的酶，而是一种专一性酶系。它能识别插入序列，并把易位子拼接到其它部位中。图15—17是易位子插入受体 DNA 示意图，在易位子两个终端是反向重复序列。

Tn2 易位子是4600b. p. 的易位子，本身能编码影响其移位的功能元件，还编码使寄主细菌细胞抵抗抗菌素——青霉素和卡那霉素的一个  $\beta$ -内酰胺酶。用重组技术已观察到能影响真正易位作用的区域，它指令合成一个 M.W = 210 00道尔顿的肽，来阻遏 Tn<sub>2</sub> 的易位，并能在转录水平上调节其本身的合成。而在一不能合成此阻遏肽的突变体中，则合成 M.W = 100, 000的另一种肽，这个肽为易位作用所必需，是一个易位子酶，它的转录方向与转录阻遏肽的转录方向刚好相反，它起始于阻遏基因

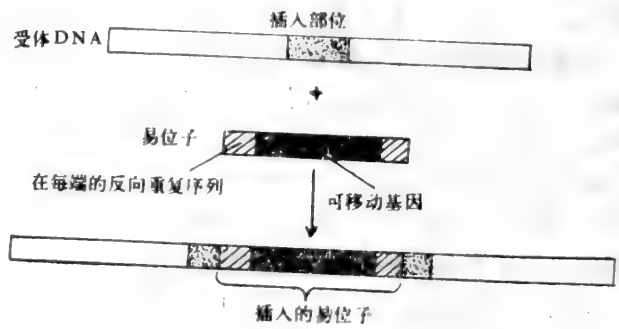


图15—17 易位子插入一受体 DNA 示意图

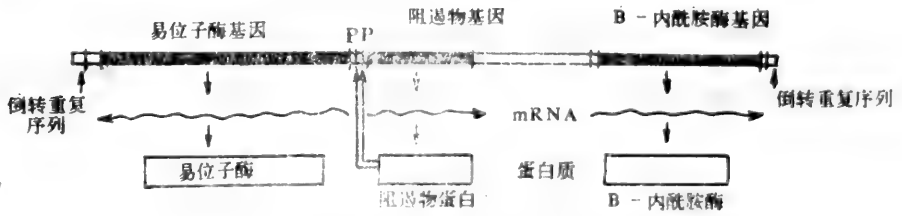


图15—18 Tn<sub>3</sub> 基因邻近区域及它们的转录方向和调节示意图

阻遏物蛋白起着从启动子 P 调节易位子酶和阻遏物基因转录的作用，这两种基因是反向被转录的。

的附近。图15—18是 Tn<sub>3</sub> 基因邻近区域的转录方向和调节示意图。Tn<sub>3</sub> 基因的插入部位和方向至少部分地决定于接受基因组的原始核苷酸序列，这可能由 Tn<sub>3</sub> 的18b. p. 的短末端倒转重复序列以及接受基因组的 AT 富集程度和同源性等的复合效应造成的。Tn<sub>5</sub> 是一个 54000b. p. 的 DNA 区段，它有150b. p. 的倒转重复序列，位于一个长25000b. p. 中心区两

侧，它编码抗卡那霉素和抗新霉素成份。有趣的是倒转重复序列在功能上有不同的特性。无论是对 RNA 聚合酶的结合，还是对新霉素抗性的启动，它所编码的多肽以及在易位过程中的全部作用都是特异的。

(二) 真核基因中的转位因素(Translocatable elements)

在玉米中，“调控因素”(controlling elements)的遗传信息与细菌中的“易位因素”的性质具有相似性。

高等真核细胞中的中等重复序列，可能是由 IS 序列构成，它具有调节功能。在果蝇中已观察到两个重复序列的特异族，称为“copia”和“412”。每种这样的特异族约有35个拷贝，分散在全部基因组中。它们的末端都连接着一短段同向重复序列，结构类似于细菌中的易位子。在培养某细胞系期间(每周每个因素转位 $10^{-3}$ — $10^{-4}$ 次)，这样的序列分散在不同的基因组部位。果蝇 *Drosophila melanogaster* 中的“412”和 *Copia* 都可有选择性地快速调换到一新的染色质部位。

酵母中也分离出了特殊殊的重复序列族，其中一个称为 Ty1，每个单倍体细胞约有35个拷贝。它由每端含有250b. p. 同向重复序列的一个5600b. p. 序列构成。每个单倍体基因组即分散于这35个拷贝中，其中包含 Ty1 因素移位的特殊序列。酵母的 his4—912 突变体是由 Ty1 插入到酵母 his4 基因5'-端非编码区而形成的。另外，转位作用也负责接合型(Mating Type)酵母的分化，接合型的转变就是在单一接合型位点上有一个 DNA 的 cassette，被含有编码相反接合型等位基因的 DNA 的另一 cassette 所取代。

(三) 免疫球蛋白基因及其调节

免疫球蛋白 IgG 是由四条肽链构成的四聚体，含两条轻链和两条重链。应答不同抗原的许多不同 IgG 分子的轻链(L)和重链(H)都由两种不同的链段构成。一个链段称恒定区(C—区)，氨基酸序列几乎不变，另一个是可变区(V—区)，任何两个 IgG 的 V—区氨基酸序列都不同，从而可应答不同的抗原。C 区的作用是用来把抗体生成细胞中的抗体，跨膜运输到血流和淋巴系统，以除去被中和的抗原。而 V—区则是负责识别和结合专一性抗原。

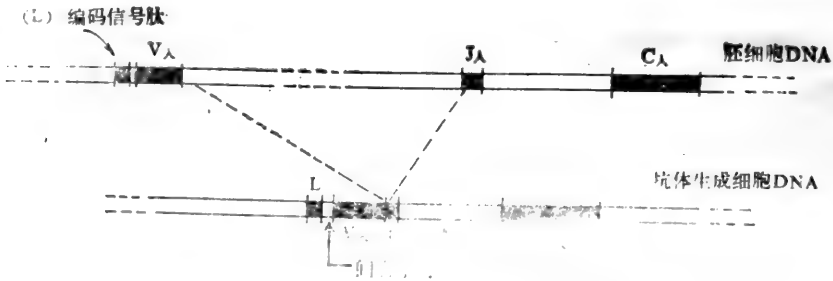


图15—19 DNA 拼接形成  $\lambda$  型 L—链的过程

有两种不同类型的轻链(称  $\lambda$  和 K)具有显著不同的氨基酸序列，但其功能相似。研究表明，在生殖系统中，某  $\lambda$  链 V 区( $V_L$ )编码序列中有一个93b. p. 的间隔序列(intervening sequence)，它位于编码疏水信号肽区，在起始密码子后约四个密码子处。此外编码序列只伸展到相当于  $V_L$  区第98个氨基酸的位置。  $V_L$  区为其它14个氨基酸编码的序列，则

以离它相当长的一段距离存在。这序列区称为  $J_L$ 。按顺序这个区离  $C_L$  编码区约为1250个b.p. 因此在引起抗体生成细胞的许多过程中, 在  $J_L$  区和  $V_L$  区之间有一DNA重组过程(如图15—19), 产生一个带两个间隔序列为轻链编码的基因。这两个间隔序列, 一个在信号肽区, 而另一个则在  $J_L$  和  $C_L$  区之间, 长度为1250b.p.

有许多基因可编码 K-型轻链。这些基因也有 V、J、C 三种类型, 约300个不同的 V-基因负责合成可变区 N-端95个氨基酸序列; 有五个不同的 J 基因负责编码 V-区, C-区13个氨基酸; C 基因只有一个拷贝, 负责编码 L-链的 C-区。在胚胎细胞中, V 和 J 基因各构成一个紧密的基因簇, 彼此相距较远, C-基因在 J 基因稍后, 所有这些基因在同一染色体上, 如图15—20。每个 V-基因之前有一前导区(leader region), 转录从那里开始, 但 J 和 C 基因没有前导区。

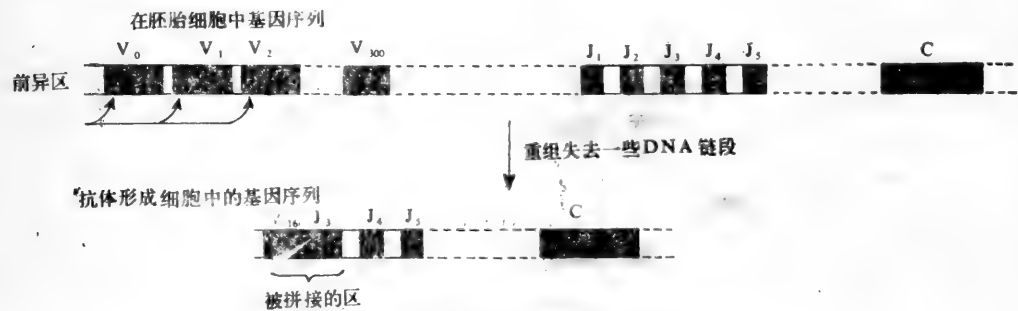


图15—20 DNA 拼接形成 K 型 L-链的过程

在图 15—20 中, 大 DNA 链段在形成抗体时, 首先要经过特殊 V 和 J 基因的重排和缺失, 如图中  $V_{100}$  和  $J_5$  之间的已经重排而失去。但有些可能是  $V_{210}$ — $J_1$  之间连结起来, 而中间的失去了。因而使不同的可变区基因序列编码出不同的 IgG 的氨基酸序列。另外在 VJ 连结处也常因碱基交换的重组作用而导致连结处氨基酸发生变化。所以在轻链上可能有  $300 \times 4 \times 25 = 3000$  个不同的可变区。

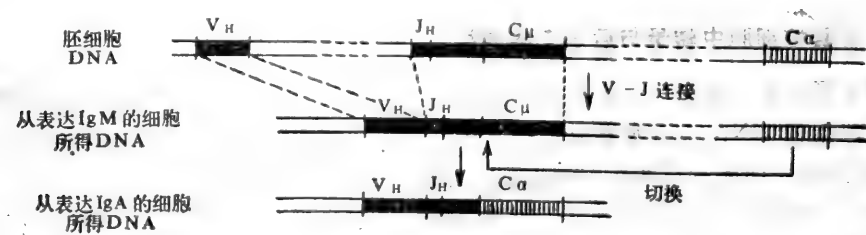


图15—21 免疫球蛋白重链基因形成过程中  $V_H$   $J_H$  的连接和  $C_H$  的切换, DNA 的重排示意图

重链的 C 区( $C_H$ )分为五类( $C_{\mu}$ 、 $C_{\delta}$ 、 $C_{\gamma}$ 、 $C_{\epsilon}$ 、 $C_{\alpha}$ )。在  $\beta$ -细胞分化的某一阶段, 每一类  $C_H$  可与  $V_H$  相连系。因此重链的基因表达好象 有开关在起作用, 在初级免疫应答中是被 IgM ( $C_H$  为  $\mu$  类) 的优势所放大; 而在次级免疫应答中则被 IgG ( $C_H$  为  $\gamma$  类) 放大; 在这个途径的终期好象有一个开关开到  $\alpha$ -类  $C_H$  而产生 IgA。关于这开关的机制, 目前普遍

认为首先是  $V_H$  和  $C_H$  基因间的整合, 随后通过缺失, 又可方便地切换成  $V_H$  和下一个等位染色质上需表达的  $C_H$  基因之间的整合 (如图15—21)。关于重链形成过程见图15—22。

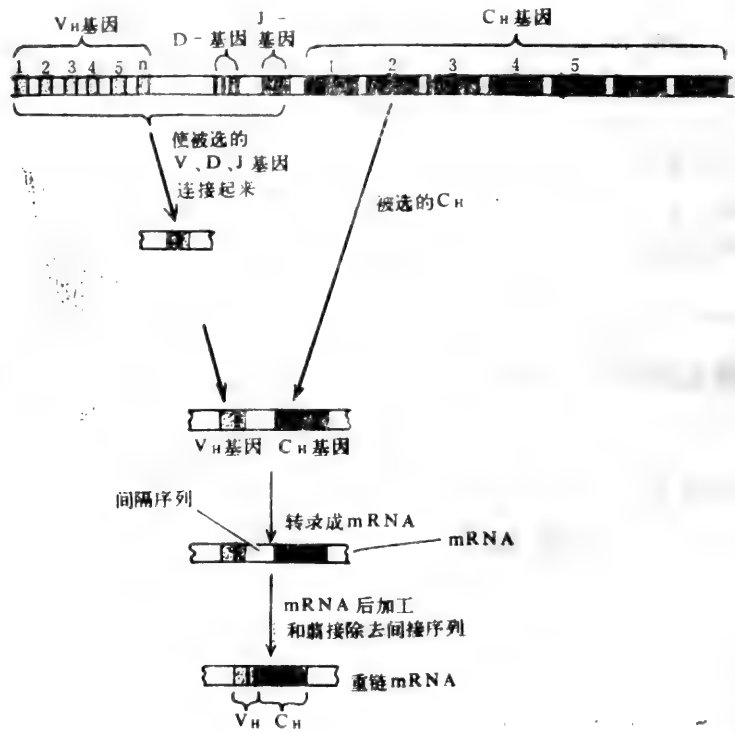


图15—22 从一个基因簇装配免疫球蛋白重链基因以及该基因经转录和后加工而形成 mRNA 的示意图

### 六、在真核细胞中转录与后加工的调控

各种分子杂交试验证明：不是所有真核基因组都能随时被转录。例如在鼠肝细胞中只有10.9%的单拷贝 DNA 序列被转录；肾、脾、胸腺和脑细胞中其转录量各为5.3%，4.8%，4.6%和15.6%。但所有这些组织的细胞，都有一公共的基因组得到表达。它们之间所以有区别是由于每种组织又另有其特有的特殊基因的表达方式。例如当肌肉细胞形成时，有一部分鼠基因的转录增加，这些基因的转录只有在分化细胞中才出现。

近代许多证据都证明：在真核细胞中，结构基因转录的变化范围远比所想象要复杂得多。Davidson 和 Britten 指出：核 RNA 既包括连续被合成的基因组中结构基因区转录成的 RNA，也包括在这些 RNA 间起调节作用的链段，还包括通过形成 DNA—RNA 双链而产生的互补重复序列转录物。他们提出了一个基因表达调节模式，在该模式中由于重复 DNA—RNA 双链的形成，在后加工过程中来调节 mRNA 的生成。而调节 DNA 区，会转录成调节 RNA。

Britten-Davidson 模型的基本内容如下：

1. 除非有专一性活化作用，所有结构基因都处于阻遏状态。
2. DNA 有一敏感部位 (Sensor site)，其邻近有一整合基因 (Integratergene) 转录成一活化 RNA (activator RNA)。
3. 有一受体 DNA 区 (receptor site) 是结构基因转录的调节区，可与活化 RNA 结合形成 DNA RNA 区，从而使邻近结构基因进行转录。可简单示如图 15—23。

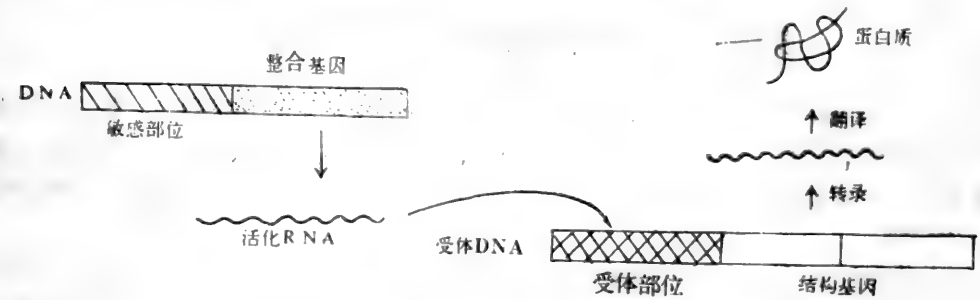


图 15—23 真核基因表达调控模型诸因素关系

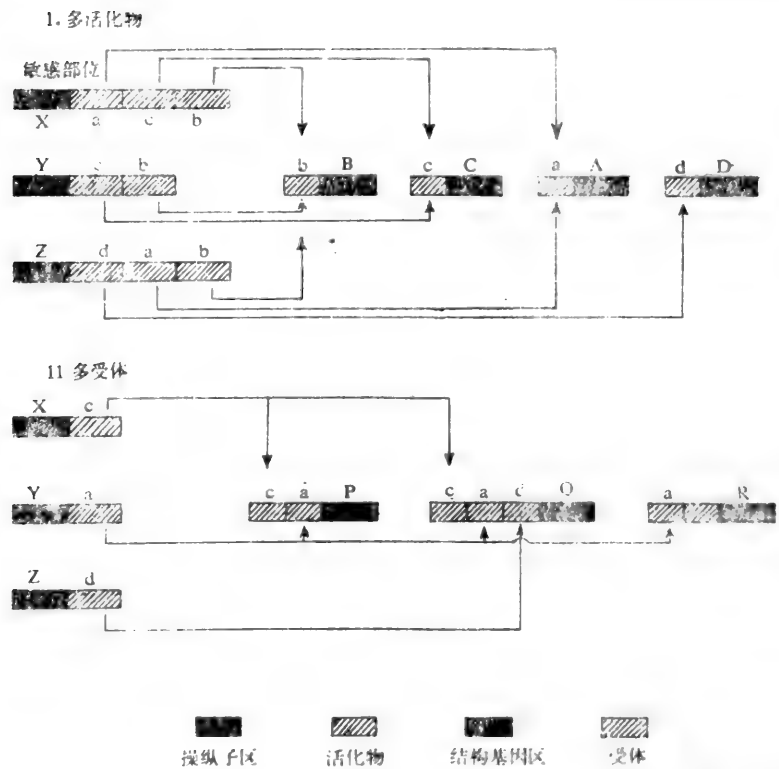


图 15—24 Britten 等的真核转录的调控模型

他们又假设真核基因组含有大量数目的敏感部位，它可识别各种信号分子。如专一性酶底物、激素受体复合物或调节 RNA 等。每一敏感部位由于结合专一性底物或激素受体复合物而激活时，整合基因立即转录出活化 RNA，它随即又被一个或更多个受体部位所识别。这些受体部位可定位于同一基因组或其它染色体上。活化 RNA 一旦结合于受体部位，其邻近的结构基因即转录 mRNA。图15—24为 Britten 等的有关真核基因转录的调控模型。

## 第二节 转录和翻译的协同调控

当 E·Coli 细菌缺乏生长所需的氨基酸时，则不仅其蛋白质合成降低，各种 RNA 的合成也会选择性的降低，这种现象称为严紧响应 (Stringent Response)。这是细胞避免浪费宝贵资源合成过多核糖体的有利措施，也是保证以少量的氨基酸维持主要蛋白质合成能力的有力措施。

关于严紧响应的机制已有许多研究成果。凡缺乏一种氨基酸或有功能的氨酰—tRNA 合成酶都会引起严紧响应。在温度敏感氨酰—tRNA 合成酶细菌突变体中，存在明显的严紧响应现象。这证明氨酰—tRNA 合成酶缺乏，则氨酰—tRNA 不能合成，这是引起严紧响应的原因。把没有严紧响应的细菌突变体 relA (称松弛菌株) 与严紧响应菌株作对比时，发现在氨基酸饥饿时，只有严紧响应菌株中会出现两个不寻常的核苷酸。最先称它为魔点，

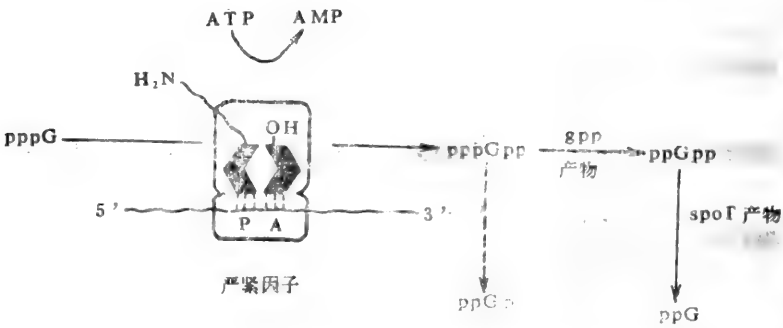


图15—25 严紧调控中不寻常鸟苷酸的合成和降解

后来证实它就是鸟苷-5′-二磷酸-3′-二磷酸(ppGpp)和鸟苷-5′-三磷酸-3′-二磷酸(pppGpp)。而松弛菌株中则没有这两种核苷酸出现。后来又在严紧菌株中发现第三种核苷酸 ppGp。这些不寻常的核苷酸的存在与 RNA 合成的抑制有密切关系。许多突变株的究研结果表明，突变株愈接近野生株，其严紧响应程度愈大，这时细胞内 ppGpp 水平也愈高，而 rRNA 的合成则愈低。这进一步证明 ppGpp 等不寻常核苷酸分子在严紧调控中所起的关键作用。

缺乏某氨酰—tRNA 合成酶能引起严紧响应又与 ppGpp 的产生有什么关系呢？从遭受严紧响应的细胞所分离的核糖体上的一个“空载”反应中，发现脱酰—tRNA 能刺激 ppGpp 和 pppGpp 的合成。可以设想：脱酰—tRNA 可能是一个诱导分子，当利用 ATP 和 GTP 合成 pppGpp 时需要 mRNA 上的一个密码子与存在于核糖体 P 一位的脱酰—tRNA 有相互识别的对应关系。现已证实这反应是由一个分子量为 75,000 道尔顿的蛋白所催化，这个蛋白称为

严紧因子。PPG<sub>PP</sub> 虽可在体外合成，但在活体内 PPG<sub>PP</sub> 主要由 PPPG<sub>PP</sub> 通过 g<sub>PP</sub> 部位的基因产物催化转变而成。PPG<sub>PP</sub> 进一步降解则成为 PP<sub>G</sub>P，这一步是由 Spot 部位的基因产物所催化。整个反应示如图15—25。

那末 PPG<sub>PP</sub> 对 RNA 的合成又是如何影响的呢？目前认为启动子的状态，可受直接作用于 DNA 或 RNA 聚合酶的某蛋白质的影响。有一种蛋白质  $\psi$  可影响 RNA 聚合酶，从而专一性地刺激 rRNA 的合成，而这种作用则受 PPG<sub>PP</sub> 抗赭。

### 第三节 基因表达在翻译水平上的调控

细菌中蛋白质合成的调节主要是在转录水平上的调节，但对 mRNA 也存在翻译水平上的调节。对原核 mRNA 翻译的调控研究得较为详细。

#### 一、在噬菌体中原核 mRNA 翻译的调控

噬菌体 R<sub>17</sub>、Ms<sub>2</sub>、f<sub>2</sub> 等的单链 RNA 能起 mRNA 作用，它们具有三个明显的顺反子，能编码 A-蛋白、外壳蛋白和复制酶亚基等三种蛋白质（图15—26）。在 E·Coli 被病毒感染期间，其体内三种蛋白质的合成量不同。在感染末期，外壳蛋白的合成量约比其它两个蛋白质大10—20倍。此外这三个蛋白的合成又有时序差异。在复制周期的早期，复制酶亚基和 A-蛋白明显占优势。而外壳蛋白则在后期占优势，并且当复制酶和 A-蛋白合成量下降时，它的合成仍在继续进行。

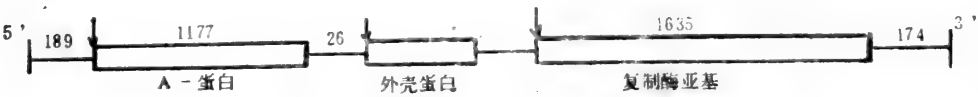


图115—26 Ms<sub>2</sub> RNA 上三个蛋白质编码区的排列顺序

这三种蛋白都有各自的起始密码子，可独立地进行起始作用。它们的翻译速度为什么又各不相同呢？较有说服力的假设，是 RNA 的二极结构对三种蛋白质的翻译速度起主要调节作用。这种调节作用超过三个起始部位对起始的定量调节。有人用温和的甲醛处理或热处理破坏 f<sub>2</sub> RNA 的二极结构，发现三种蛋白被翻译的相对量发生改变，复制酶的合成量可增加到外壳蛋白水平，A 蛋白量也有显著增加。这证实了 RNA 的二极结构对三种蛋白翻译速度起调节作用的假设。分析图15—27 Ms<sub>2</sub>RNA 的二极结构可以看出，复制酶的起始部位以氢键与外壳蛋白 mRNA 的一部分链段结合，而外壳蛋白的起始部位是裸露的。这样的二级结构说明，外壳蛋白在复制酶起始翻译前就已翻译了一部分。有人设法使外壳蛋白第六个密码子发生突变，发现复制酶顺反子的翻译受到严重阻遏，相反50、54、70等密码子发生突变对复制酶的翻译则无阻遏作用。另外用甲醛处理过的六位突变 RNA 进行翻译时，复制酶的表达亦无阻遏。这一系列事实充分说明翻译 Ms<sub>2</sub>RNA 外壳蛋白起始部位的头六个氨基酸时，复制酶顺反子起始部位与外壳蛋白顺反子间的氢键尚未断裂，所以复制酶的翻译会因这个突变

而遭到阻遏。而当外壳蛋白顺反子已翻译到50个密码子以后时，两个顺反子间的氢键则已经断裂，复制酶顺反子的翻译就不会因外壳蛋白顺反子的突变而遭到阻遏了。这进一步证实了RNA的二级结构对复制酶的翻译起调节作用。

噬菌体感染晚期，为什么外壳蛋白的量远大于复制酶亚基的量呢？这是由于外壳蛋白能专一性地结合于复制酶顺反子的起始部位，从而抑制复制酶亚基的翻译。所以在感染晚期，随着外壳蛋白的建成和增加，复制酶亚基的合成必然下降。那末感染早期为何复制酶亚基的合成量明显超过外壳蛋白？目前有两种解释。一种认为，复制酶亚基必需与核糖体的S<sub>1</sub>蛋白结合才能成为寄主专一性复制酶的一个亚基。而S<sub>1</sub>蛋白又能抑制外壳蛋白的翻译。所以在感染早期复制酶顺反子起始部位一定还有一种非氢键结构，使它起始翻译而不受外壳蛋白

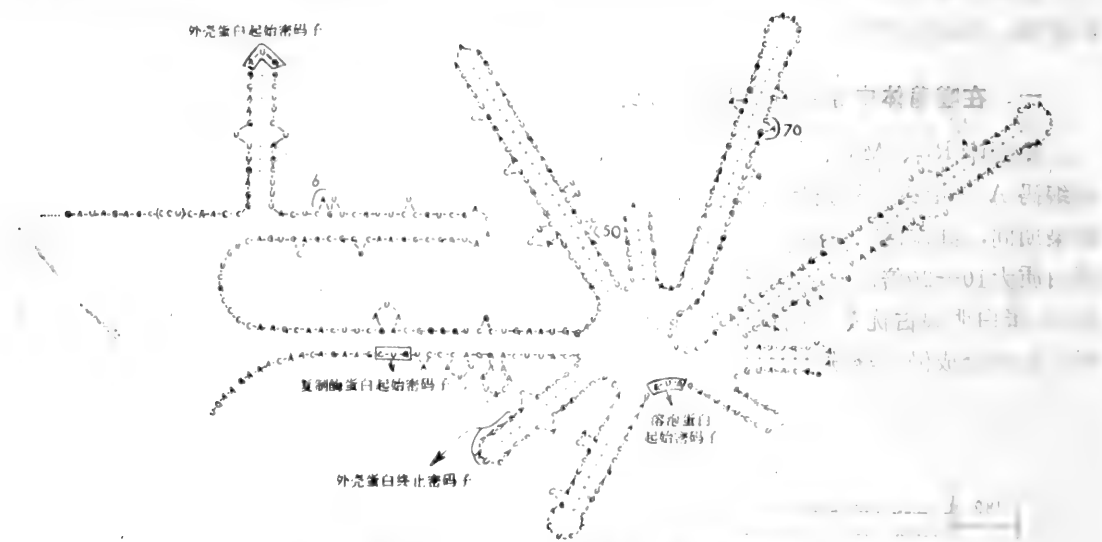


图15-27 MS<sub>2</sub> RNA 的二级结构

翻译的影响。而这时外壳蛋白则因受S<sub>1</sub>蛋白的抑制不能起始翻译，只有待复制酶大量建成并不断与S<sub>1</sub>蛋白结合后，S<sub>1</sub>蛋白对外壳蛋白翻译的抑制才得以解除。另一种解释是，在活体内有一种抑制作用与S<sub>1</sub>蛋白整合进复制酶亚基中有关，其目的是阻止核糖体沿5'→3'方向起始外壳蛋白，使复制酶得以顺利地由3'向5'方向移动。已经证明复制酶结合于RNA的3'-端进行病毒RNA的复制，这正是外壳蛋白顺反子起始翻译的部位。S<sub>1</sub>蛋白的结合部位已从RNA中鉴定，它既靠近Qβ RNA的3'-端的复制起始区，也靠近外壳蛋白顺反子的5'-端起始区，这说明在感染早期，一旦S<sub>1</sub>蛋白整合进复制酶亚基进行病毒RNA的复制，必然会抑制外壳蛋白的合成（图15-28）。

二、翻译产物在细胞内定位的控制

被真核或原核细胞所合成的某种蛋白质，如果指定要分泌出来或者在原核细胞中指定要隔离存在于外周间隙，则合成这些蛋白质的核糖体在真核细胞中定位于粗内质网而在原核细胞中则定位于内层细胞膜上。随着蛋白质的合成，蛋白质即经膜而伸展，在真核中则从内



质网的酯泡池 (cisternae) 经高尔基器分泌空胞。这样分割的基础至少部分是由于 mRNA 中有一编码疏水信号肽的序列。产生的这种带信号肽的蛋白质, 由于它对疏水膜的亲和力, 能携带合成的蛋白质横跨疏水膜。

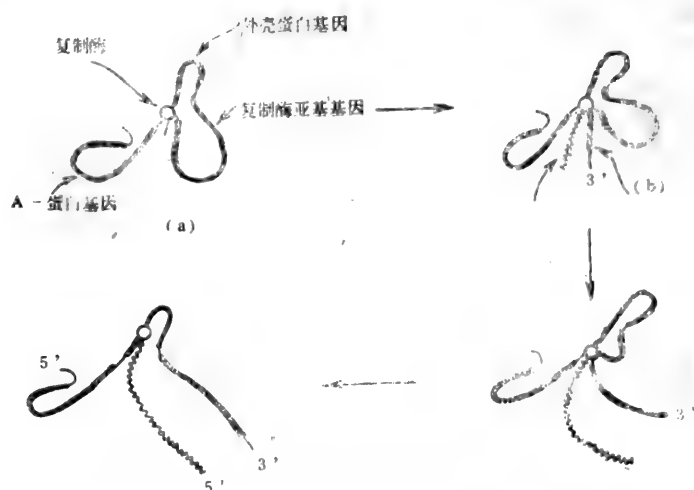


图15—28 Q $\beta$  RNA 复制的起始与它对外壳蛋白顺反子翻译的抑制模型

(a) 复制酶结合于靠近外壳蛋白顺子5'-端, 阻止核糖

体进一步结合。(b) 当所有核糖体已逸出外壳蛋白和复制酶顺反子

3'-端时, 复制酶又仍然结合于外壳蛋白起始部位, 复制酶进行复制。

(c) 复制酶进一步复制进入复制酶顺反子区。当外壳蛋白尚未被翻

译时, RNA 的二级结构阻止外壳蛋白翻译。(d) 复制达外壳蛋白

顺反子区时, 复制酶有时会离开外壳蛋白起始区而进入 A-蛋白顺反子区。

在大部分情况, 这信号肽是成熟蛋白质 N-端的一个延伸部分, 在蛋白质穿过膜后即被切去。(图15—29)。信号肽长度大约为15—30个氨基酸序列。各种信号肽除都具有疏水性和切割部位邻近都有一小氨基酸两个共性外, 它们的氨基酸序列很不相同。某些信号肽如被分泌的输卵管蛋白和卵清蛋白的信号肽, 处于蛋白质分子内部的一个结结区。这样的新生蛋白将从其内部一点开始穿过膜而伸展, 而不是从 N-端开始伸展。

类似子分泌蛋白的信号肽也存在于某新生膜蛋白中, 而过去蛋白质则堆积于它们合成处的膜上, 在真核中它们以后可流到质膜上。这些蛋白质可能具有一些结结特性, 以阻止其本身象分泌蛋白那样经膜而伸展。目前曾提出了一个普遍名词: 局步化序列 (Topogenic sequence) 来称谓调节这样方向的各种不同的信号肽。

### 三、mRNA 寿命的调控

对 mRNA 寿命的调控在真核中的存在已得到许多实验证明。有证据认为许多 mRNA 的一个内在特性是 mRNA 的 Poly(A) 序列可影响 mRNA 的降解。失去 Poly(A) 或 Poly

(A)减少到某最小长度,都会使 mRNA 易受外切核酸酶作用。这个主张受到许多证据支持。例如:细胞质 mRNA 的 Poly(A) 序列随时间的增长而逐渐缩短;缺少 Poly(A)的组蛋白 mRNA 比大部分真核 mRNA 短命;把去腺苷酸的珠蛋白 mRNA 注射进爪蟾卵母细胞后,其翻译能力比注射正常珠蛋白 mRNA 翻译能力小,但当该 mRNA 加到只对短周期维持翻译的无细胞系统中时,则其翻译能力不减小。

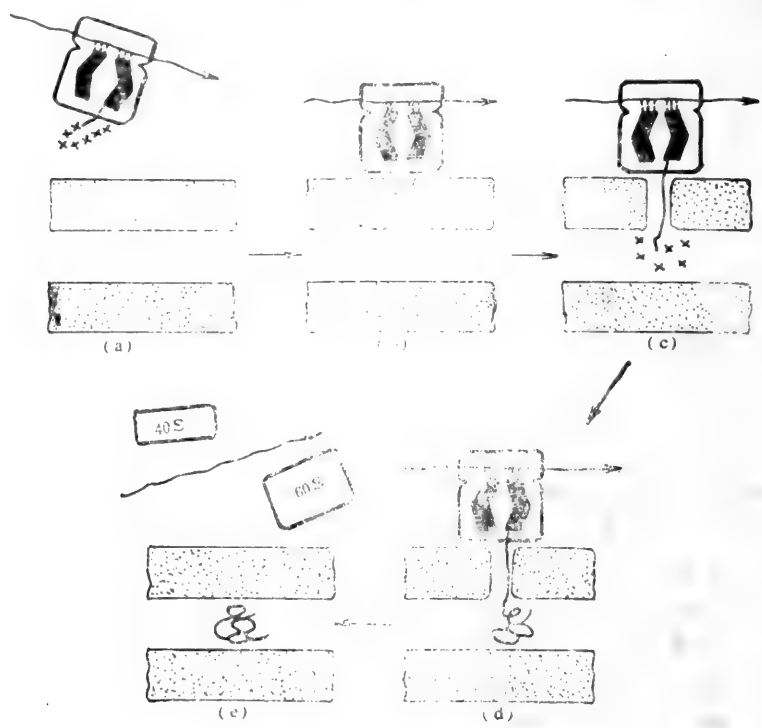


图15-29 分泌蛋白质进入内质网膜模型

(a)起始合成 N-端带信号肽一个分泌蛋白的自由核糖体;(b)信号肽结合于膜上经膜伸向腔中,(c)信号肽已翻译完成并经初切;(d)正在伸展的蛋白肽链继续伸展过膜;(e)蛋白翻译完成后向高尔基器和分泌胞移动,核糖体亚基释放。

虽然 mRNA 对降解的敏感性不完全随其 Poly(A)大小的下降而增大,但当 Poly(A)的大小降到某定值时,mRNA 会忽然变得对降解非常敏感。由于我们对真核 mRNA 降解的机制还不甚了解,我们只能根据 Poly(A)所起的表现效应来推测。然而值得一提的是,至少已发现有一种蛋白质,它能与多核糖体的 Poly(A) 区相结合,可能它就是用来保护 mRNA,使之免受降解。

#### 四、翻译的定量控制

许多能以某种方式改变真核细胞蛋白质合成速率的环境,似乎也 以同样程度影响所有

mRNA 的翻译。对其机制有所了解的唯一细胞是网织红细胞。凡能使网织红细胞蛋白质合成受抑制的各种条件，似乎都是影响相同的起始组分。

研究得最多的是血红素的调节功能。兔网织红细胞胞溶物中缺少氯高铁血红素时，就会造成蛋白质合成迅速受抑制。早已证实在失去氯高铁血红素的细胞中，蛋白质合成的起始作用会受抑制。它所抑制的反应是  $\text{Met-tRNA}^{\text{Met}}$  对 40 S 亚基的结合，这一反应需要  $\text{eIF-2}$ 。

那么抑制这起始作用的抑制剂是什么呢？它与血红素的关系又是如何的呢？

这抑制剂已从胞溶物中纯化，是一个细胞质蛋白，它以非活性形式预先存在于正常细胞中，称为血红素调控的阻遏物[haem-controlled repressor (HCR)]或血红素调节的抑制物[haem-regulated inhibitor(HRI)]。它是一个不依赖于 cAMP 的蛋白质磷酸激酶，专一地使  $\text{M} \cdot \text{W} = 35000$  道尔顿的  $\text{eIF-2}$  小亚基磷酸化，故又称  $\text{eIF-2}$  激酶。所以 HCR 对蛋白合成的抑制，是通过  $\text{eIF-2}$  这个起始因子的磷酸化，从而阻止 40S 核糖体亚基·

$\text{Met-tRNA}^{\text{Met}}$  起始复合物的形成而实现的。这是由于  $\text{eIF-2}$  磷酸化成为  $\text{eIF-2-P}$  以后，失去了作为起始因子参与蛋白质合成的能力。关于血红素如何刺激蛋白质合成的详细机制虽尚完全弄清，但从一些结果看，氯高铁血红素的作用可能是它与无活性的 HCR 结合，使 HCR 失去激酶活性， $\text{eIF-2}$  不能再遭受磷酸化，因而恢复了蛋白质合成能力。

虽然  $\text{eIF-2}$  的磷酸化可以解释缺乏血红素对蛋白质合成的抑制，但并不是在任何条件下  $\text{eIF-2}$  的磷酸化都与其抑制蛋白质合成活性相吻合。现已找到一种抗抑制蛋白是一种脱磷酸因子，对  $\text{eIF-2}$  显示磷酸酶活性。目前对这个脱磷酸因子的去磷酸化作用及其调控机制，以及是否与血红素有关等，还缺乏了解。

除血红素外，低浓度的双链 RNA，谷胱甘肽甚至与超离心相联系的升压等因素也能使蛋白抑制剂活化。所以血红素并不是对  $\text{eIF-2}$  磷酸化的唯一调节物。

## 五、翻译的定性调控

除了上述在细胞中对所有 mRNA 翻译的调节外，还有对专一性蛋白 mRNA 翻译的选择性刺激和抑制的调节实例。兹介绍如下：

### (一) 干扰素

干扰素是病毒感染动物细胞后而产生的一种糖蛋白。它可作用于邻近未感染的细胞使它们抗感染。用干扰素处理寄主细胞，病毒 mRNA 的转录和翻译都同样受到抑制。这里介绍它对病毒 mRNA 翻译的抑制。

在病毒 RNA 复制期间可产生一种双链 RNA，它可诱导细胞合成干扰素。当将此双链 RNA 加入到干扰素处理过的细胞胞溶物中时，对蛋白质合成的抑制比用双链 RNA 或干扰素单独处理所引起的抑制大得多。这种处理后果，一是活化蛋白激酶，这蛋白激酶再去磷酸化  $\text{eIF-2}$  和另一未知功能蛋白质，造成蛋白质合成的抑制。二是活化一个酶，它催化三核苷酸  $\text{pppA}^{2'}\text{p}^{5'}\text{A}^{2'}\text{p}^{5'}\text{A}$  的合成，然后这三核苷酸再去活化降解 mRNA 的一个核糖核酸酶和降解 tRNA 末端  $\text{---C---A}$  的一个磷酸二酯酶，从而使 mRNA 的翻译受到抑制。

干扰素对 mRNA 翻译的抑制是干扰素能防治病毒感染的理论依据，尽管病毒多种多样

样,在干扰素处理的细胞中它们的复制都会受到抑制。在体外胞溶物中干扰素对病毒 mRNA 翻译的抑制也是不专一的。而且在活体内干扰素还负责对专一性寄主蛋白质合成的抑制作用。这专一性抑制作用是否通过非专一性抑制作用产生呢?有人设想病毒 mRNA 比寄主某 mRNA 对核糖体有较高的亲和力,干扰素是抗高亲和力 mRNA 最有效的抑制剂,所以对病毒蛋白质合成有较大的抑制作用而对寄主蛋白质合成的抑制则较小。这种抑制作用似乎是抑制肽链的延伸,而不抑制肽链的起始。对细胞 mRNA 和病毒 mRNA 翻译中延伸抑制剂的研究支持这一观点。但对干扰素如何抑制病毒肽链的延伸其机制尚不清楚。另外干扰素对病毒蛋白合成的专一性抑制作用或许只在病毒 mRNA 的一个部位上产生,它们的抑制作用基本上限制在对这些部位上的翻译,而随着它们在细胞中扩散而离开那些部位,其抑制作用即迅速消失。

## (二)病毒抑制寄主蛋白质的合成

许多真核病毒专一性地抑制其寄主蛋白质的合成。这种抑制作用包含着许多不同机制。对一种类型病毒至少存在一种非普遍的机制。例如脊髓灰质炎病毒是不寻常的。它的 mRNA 缺乏 5'-帽子结构,因此翻译它的 mRNA,不需要翻译带帽 mRNA 所需的帽子结合因子,所以脊髓灰质炎病毒感染的后果,会导致帽子结合活性的丧失,从而抑制了寄主 mRNA 的翻译,而对病毒 mRNA 的翻译则有利。

一些真核病毒有一共同的机制来抑制寄主蛋白质的合成,这机制是由于病毒 RNA 的结构特点,赋予它们对核糖体的高亲和力,这样的高亲和力可以经起始因子而传递。如脑心肌炎病毒 RNA(encephalomyocarditis viral RNA)在争夺 eIF-4B 方面超过寄主 mRNA,从而可抑制寄主 mRNA 的翻译。

## (三)细胞 mRNA 的多种不同翻译功能

不同细胞对翻译不同 mRNA 的功能不同。例如肌球蛋白 mRNA 在兔网织红细胞无细胞系统中远不及在小鸡肌肉细胞无细胞系统中翻译得好。而对珠蛋白 mRNA 的翻译二者则刚好相反。最近人们把这种差别归因于两者所含专一性复合组分 eIF-3 的差异。

另一个可能性是各起始因子的相对量,在不同细胞中不同。从而能有区别的影响对这些因子有不同亲和力的 mRNA 的翻译,或对各因子有不同需求的 mRNA 的翻译。现已知各种 mRNA 对 eIF-4A 的需求上有不同。有人向网织红细胞无细胞的系统中加入 eIF-4A 和 eIF-4B 则合成的  $\beta$ -珠蛋白多于  $\alpha$ -珠蛋白,因此推测, $\beta$ -珠蛋白 mRNA 对这些因子的亲和力比  $\alpha$ -珠蛋白 mRNA 高。

# 第十六章 基因工程——重组 DNA 技术

基因工程或遗传工程是七十年代发展起来的一项生物工程技术，是分子生物学领域里的一项重要突破。基因工程从本质上是 DNA 重组技术的应用。它是基于这样一种事实建立起来的，即在实验中可以把外源基因人工地组合到适当的 DNA 载体上，形成一种新型的基

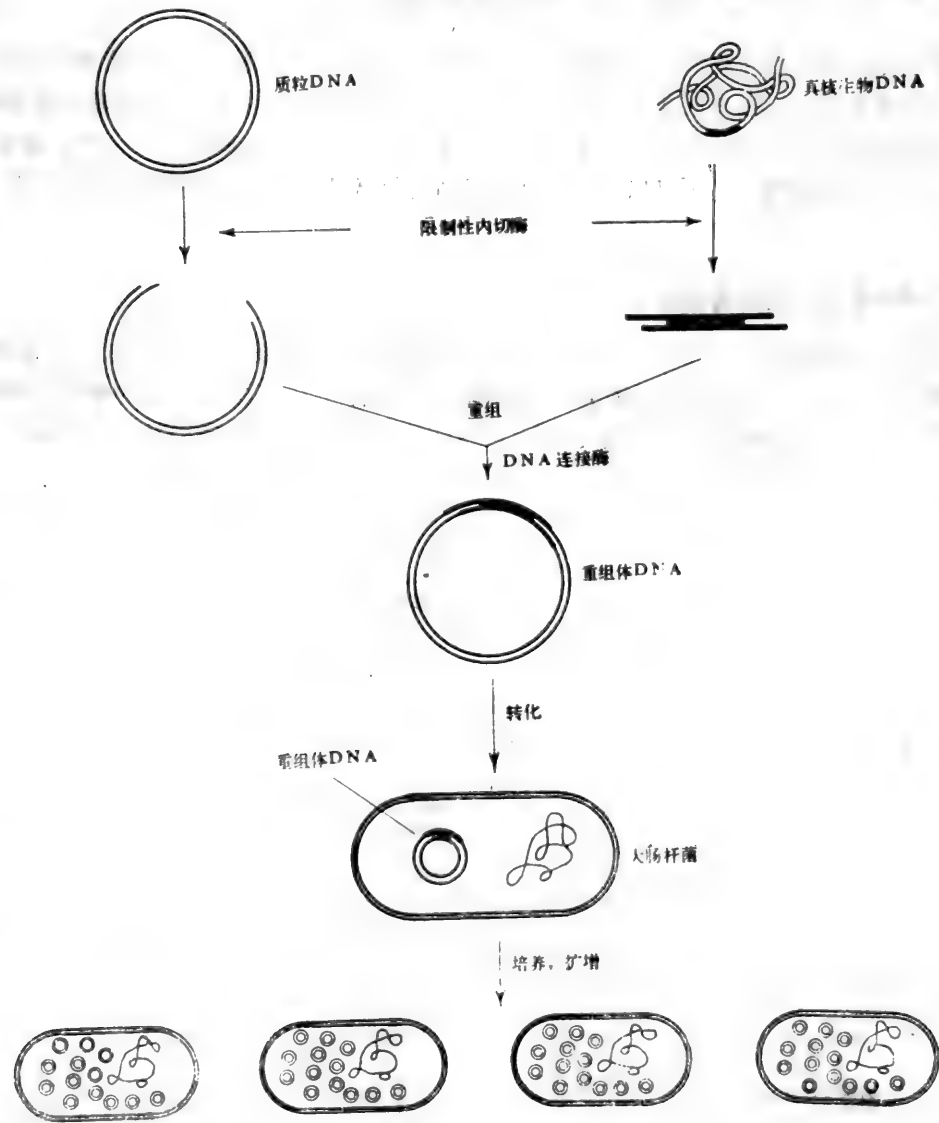


图16—1 基因工程操作示意图

因组，这种基因组可以导入到适当的受体细胞中，并可通过受体细胞的 DNA 合成机构扩增许多倍，甚至被组合到载体上的外源基因可以在受体细胞中转录和翻译。

基因工程是一项知识面宽、技术难度比较大的工作。在这里，我们仅就把真核生物基因转移到细菌中去的基因工程操作技术的一般原则和程序作概括性的介绍。基因工程的操作程序大致分为①外源基因的分离，②载体 DNA 的制备，③限制性内切酶处理，④体外连接（重组），⑤转化和克隆，⑥筛选以及表达产物的鉴定等方面。

基因工程的基本过程如图16—1所示。

## 第一节 外源基因的分离

基因工程的主要意义是为了大量获得具有重要经济价值的物质和人类所需要的而一般不容易制备的贵重药品。因此，正确选择外源基因是非常重要的。然而，一个简单的细菌DNA就大约有3,000个以上的基因，那就更不用说真核生物染色体上的基因数了。要从众多的基因中挑选目的基因的困难是可以想象的。目前用到的分离目的基因的方法大体上有以下几种。

### 一、cDNA 法（反向转录法）

cDNA (complementary DNA) 法是分离外源目的基因的最有效的方法。它是利用反向转录酶 (Reverse transcriptase) 以 mRNA 为模板合成与 mRNA 互补的单股 cDNA，再以单股的 cDNA 为模板合成双股 cDNA (dsDNA)。mRNA 是基因转录的产物，这样

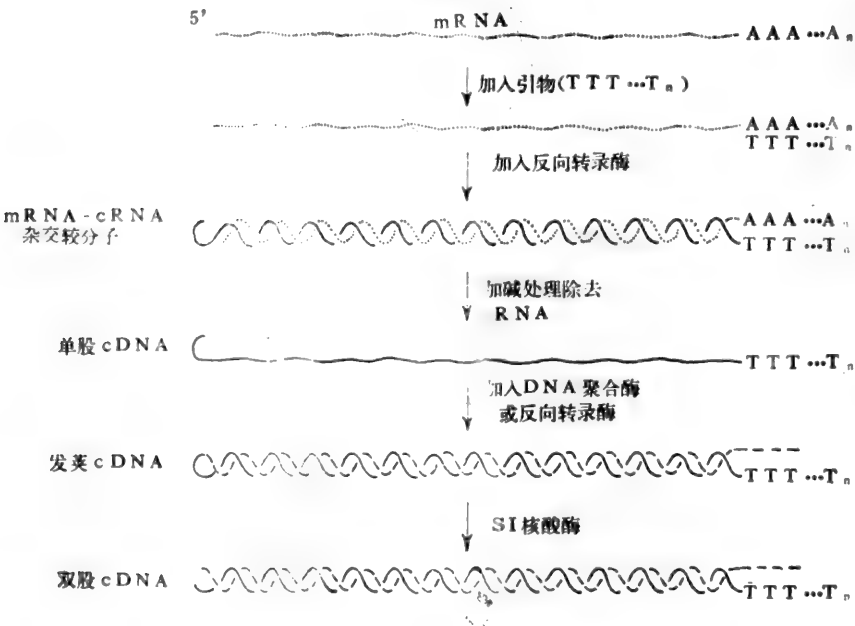


图16—2 从 mRNA 模板合成双股 cDNA

合成的双股 cDNA 就是编码该 mRNA 的基因。目前, 已经有了分离单一纯净的 真核生物 mRNA 的有效方法(见第四章第七节)。cDNA 法合成基因的过程如图 16—2 所示。这个方法的优点是省去冗长而复杂的筛选目的基因的程序, 并排除了基因中可能存在的插入顺序。这种含有插入顺序的外源基因的转录产物不可能在细菌宿主细胞中得到正确的加工。

## 二、限制性内切酶法

目前已有许多可供基因工程使用的限制性内切酶。用限制性内切酶降解基因组 DNA 可以产生许多限制性片段, 不经分离, 直接用于重组, 然后去筛选鉴定目的基因是否转化成功来予以确定。这种方法称为散弹枪克隆(Shotgun cloning)。此法有许多缺点。第一, 在目的基因的中间可能有限制性内切酶的切点, 当然可以用不同的限制性内切酶去切割基因组, 以便使这种可能性减少到最小。第二, 需要冗长而复杂的筛选鉴定工作。但这个方法的一个最为有用的优点是能产生粘性末端(有些酶例外), 这对重组体的建立是有利的。

## 三、基因的化学合成

某些编码分子很小的蛋白质基因或多肽基因可以用化学合成的方法进行合成。例如人胰岛素基因和生长激素释放抑制因子基因化学合成后在大肠杆菌内表达成功。

除上述方法外, 还有其他几种分离基因的方法, 这里不一一说明。

## 第二节 载体

用上述方法分离得到的基因, 即使能够单独进入到受体细菌细胞, 也不能够增殖和表达。只有将外源基因同具有自主增殖(即复制)能力的 DNA 共价组合在一起, 才能增殖。这种能将外源基因送入受体菌细胞, 并能自主增殖的 DNA 即称为基因载体(Vector)。

作为基因的载体应符合下列要求:

- (1) 必须具有自主增殖的能力, 甚至在经某一限制性内切酶处理后也不失去自主增殖的能力。因为通过基因工程所建立的基因克隆(clone, 即无性繁殖系)的目的是为了要求得到最大量的某个基因的产物, 所以一方面要求载体具有自主增殖的能力, 另一方面还要求能在受体细胞内尽量地扩增, 复制出许多拷贝。

- (2) 分子量应尽量小些。因为载体愈大, 它本身编码的蛋白质就愈多, 这对于获得它所运载的外源基因编码的蛋白质来说是不利的。载体太大, 不易转化, 而且某一限制性内切酶的作用部位也会相应增多。

- (3) 至少应具有一个标记能使被转化的重组体容易检出。

- (4) 对某种限制性内切酶来说, 它在载体上的识别部位愈少愈好, 最好只有一个(或两个)。因为切点多, 产生的载体 DNA 片段也就多, 形成有复制能力的重组体的机会也就会小。

- (5) 为了使外源基因在宿主细胞内表达, 载体上启动转录的基因(启动基因)不应受到破坏。有时可以把外源的强启动基因(例如乳糖操纵子启动基因)嵌合到某种载体上。

此外, 还应考虑到载体的安全性能。载体不能随便转移, 不能离开宿主细胞生存。

目前使用的载体大多是细菌质粒 (plasmid)。此外,某些病毒 DNA 也可以作为载体使用。这些被使用的载体基本上都符合上述要求。

一、质粒

质粒 pBR322 是人们常用的一种载体。它是一种只有约4000碱基对的共价闭合的环状小分子 DNA (图 16—3)。pBR322 含有两个抗药性基因,一个是抗氨苄青霉素的基因,另一个是抗四环素的基因。这两个基因分别编码能分解氨苄青霉素和四环素的酶。在抗氨苄青霉素的基因上只有限制性内切酶 Pst I 和 Pvu 各一个切点,在抗四环素的基因上只有 Hind III、BamH I 和 Sal I 各一个切点。如果这两个

抗药性基因完整地存在,它所在的宿主细菌则能在含有氨苄青霉素和四环素两种抗菌素的培养基上生长。如果外源基因插入到 Pst I 切割的部位,则含有重组体的宿主菌只能在含有四环素的培养基中生长,而对氨苄青霉素很敏感;反之,若外源基因插入到 Hind III、BamH I 或 Sal I 的切割部位,则含有重组体的宿主菌只能在含有氨苄青霉素的培养基上生长,而对四环素敏感。利用这两种抗药性标记的存在与否,来鉴定和筛选重组体是十分有效的。但是,质粒 pBR322 也有它的缺点,这就是它的唯一的 EcoR I 切点并不

位于上述两种抗药性基因上,这样就不能用这种广泛使用的限制性内切酶产生可供筛选的重组体。

在质粒 pBR322 的基础上,经过改造,组建了许多新的质粒。这些质粒的另一个显著特性是,即使在培养基中含有氯霉素(它能抑制宿主蛋白质的合成)的情况下,它们也能在每个宿主细胞中复制出几千个拷贝。这种类型的质粒受宿主染色体的控制较松,因此称为松弛型质粒。

质粒 DNA 及其重组体很容易分离(见第四章第七节),这对在基因工程上快速分离鉴定重组体是很有利的。

另一组可使用的质粒载体是从 ColEI 衍生出来的。质粒 ColEI 能编码大肠杆菌素 E (Colicin E)。大肠杆菌素 E 是一种能杀死大肠杆菌某些菌株的毒蛋白。这组大肠杆菌素生成质粒作为载体的优点是,它们的复制不受严格控制。在每个被感染

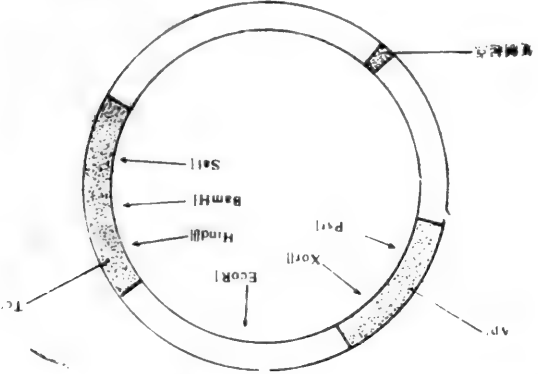


图16—3 质粒 pBR322。Ap<sup>r</sup> 代表氨苄青霉素抗性基因, Tc<sup>r</sup> 代表四环素抗性基因

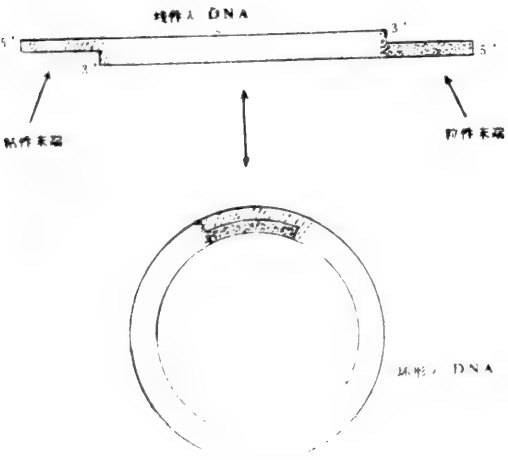


图16—4 线性 λ-DNA 转变成环形

白。这组大肠杆菌素生成质粒作为载体的优点是,它们的复制不受严格控制。在每个被感染



的细胞中一般约有25个拷贝存在。用氯霉素 (Chloramphenicol) 处理, 能抑制宿主蛋白质的合成和染色体的复制, 但是质粒 ColE I 象 pBR322 那样也能在此条件下继续复制。事实上, 在用氯霉素处理过的细胞中, ColE I 能复制上千个拷贝。

二、病毒 DNA

某些病毒 DNA 亦可作为外源基因的载体。比较常用的病毒 DNA 载体是经过改造的  $\lambda$  噬菌体 DNA ( $\lambda$ -DNA)。 $\lambda$ -DNA 在病毒粒子 (virion) 是双股线性分子。在它的线性分子的5'-端含有12核苷酸顺序的粘性末端。它的两个5'-端的粘性末端彼此互补, 可以配对。实际上,  $\lambda$ -DNA 在感染宿主细菌 (大肠杆菌) 后, 它的两个粘性末端彼此互补配对结合, 使其由线性转变成环形 (图16—4)。每股的5'-端的磷酸基与它的3'-端的 -OH 靠近, 然后由宿主 DNA 连接酶 (Ligase) 形成磷酸二酯键, 将两端完全连接。

$\lambda$ -噬菌体是一种温和噬菌体。温和的噬菌体感染细菌后, 细菌不裂解而能继续生长繁殖, 成为溶原性细菌 (Lysogenic bacterium)。温和噬菌体 DNA 在一特定的部位上同细菌染色体 DNA 重组结合在一起, 与细菌染色体 DNA 一道正常地复制。这时, 噬菌体 DNA 是细菌染色体 DNA 的一部分。这种形式叫做前噬菌体 (Prophage)。含有前噬菌体的细菌具有免受同源噬菌体再次感染的免疫能力。噬菌体与宿主细胞的这种共生关系, 称为细胞的溶原性 (Lysogeny)。但在某些理化因素的诱导下, 这种溶原性受到破坏, 噬菌体 DNA 就从宿主染色体 DNA 上切除下来, 利用宿主细胞的机构合成大量的噬菌体蛋白质和噬菌体 DNA, 并包装组合成病毒粒子, 使细胞溶解 (图16

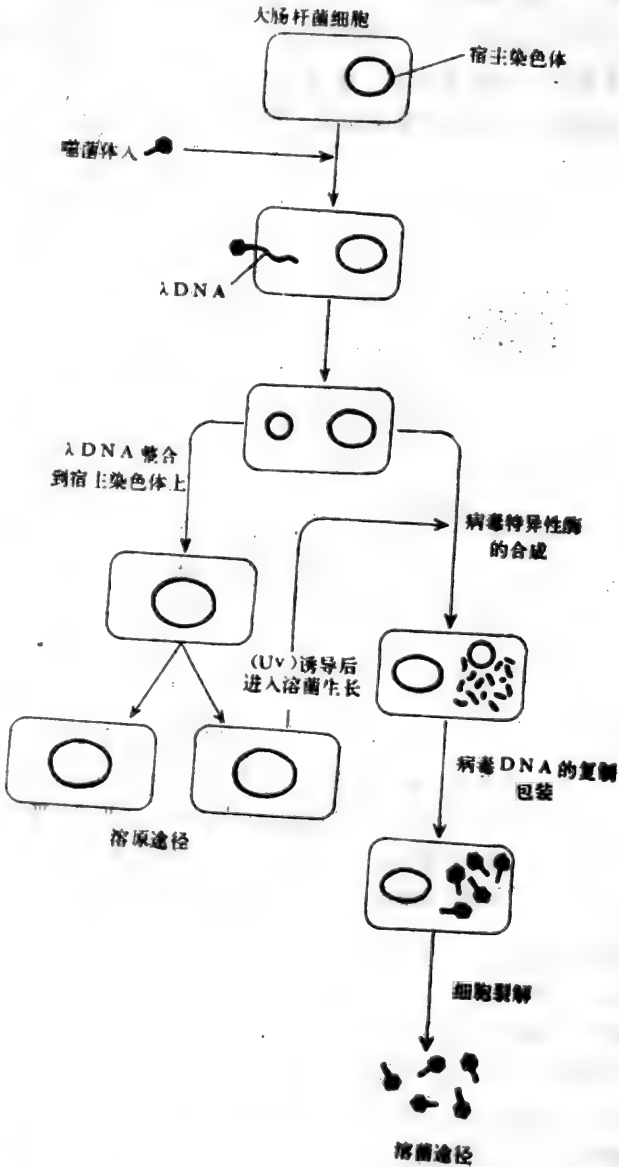


图16—5  $\lambda$ -噬菌体感染宿主菌后的溶原和溶菌生长

图16-5)。噬菌体感染细菌后，亦可直接进入溶菌生长状态，即噬菌体 DNA 进入到

细胞后，利用宿主的复制机构复制出许多拷贝，并合成噬菌体蛋白质，包装成子代病毒粒子，最后导致细胞溶解（图16-5）。

$\lambda$ -噬菌体感染细菌细胞后，细菌细胞溶原性的建立、维持以及细胞溶解都是通过  $\lambda$ -DNA 基因组的表达的调节控制实现的。

$\lambda$ -DNA 基因组已经有了很好的了解。它是由多个操纵子组成的时间程序控制系统，即由一个总控制操纵子、两个早期操纵子和一个晚期操纵子组成（图16-6）。在溶原状态中， $\lambda$ -DNA 基因组中只有些基因进行表达，即只有总控制操纵子表达。这个操纵子的结构基因  $cI$  编码一种阻遏蛋白。阻遏蛋白与  $cI$  基因左右两侧的两个操纵基因  $O_L$  和  $O_R$  结合，抑制左向和右向两个早期操纵子的转录，从而使细胞处于溶原状态。这个阻遏蛋白也作为一种免

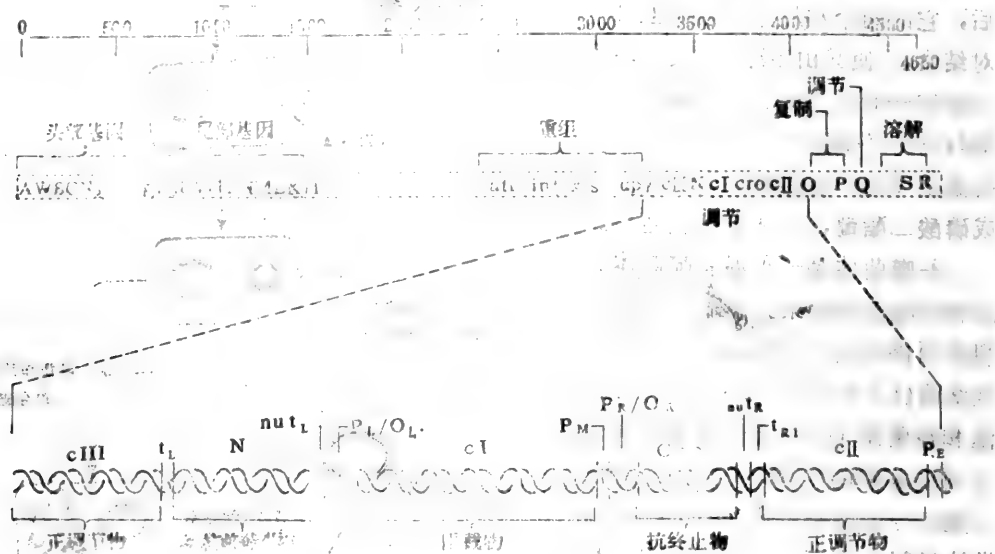


图16-6  $\lambda$ -DNA 基因图

$cI$  基因编码  $cI$  蛋白。 $cI$  蛋白结合在  $O_L$  和  $O_R$  时抑制早期操纵子的转录。

$P_M$  是启动  $cI$  基因转录的启动区。 $cII$  和  $cIII$  基因的产物能促进  $cI$

基因的表达。 $N$  基因编码的  $N$  蛋白，与  $nut$  部位作用，具有抗转录终止的能力。

$Cro$  基因编码的  $Cro$  蛋白具有抗阻遏物的作用，抑制  $cI$  基因的转录。

疫性物质阻止细胞再次感染。在某些物理和化学等因素例如紫外线的诱导下，阻遏蛋白失去活性，从而解除了对左右两个基因（ $N$  基因和  $Cro$  基因）转录的控制，使左向和右向两个操纵子开始转录，前细菌体状态的  $\lambda$ -DNA 从细菌染色体 DNA 上释放出来，进入溶菌状态（图16-7）。 $N$  基因和  $Cro$  基因的转录和表达对于  $\lambda$ -DNA 基因组完全表达是极为重要的。 $N$  基因是位于  $cI$  基因左侧的中早期（immediate early）基因， $N$  基因的表达产物  $N$  蛋白是一种抗转录终止因素，它能使转录从中早期进入到迟早期（delayed-early）阶段。若  $N$  蛋白缺乏，转录则终止在中早期的终止部位上，不能使  $\lambda$ -DNA 基因组继续转录和表达。 $Cro$  基因位于  $cI$  基因右侧另一个中早期基因，它编码的  $Cro$  蛋白具有抑制阻遏

蛋白(cI基因编码)合成的作用。

左向迟早期基因转录后产生的蛋白质是与重组有关的,可以使噬菌体 DNA 从宿主染色体上释放出来,成为环形的 λ-DNA。这时晚期操纵子重新结合起来构成了一个完整的转录单位,右向迟早期基因转录后产生的蛋白质是与 λ-DNA 复制有关的酶,以及晚期基因转录所需要的 Q 蛋白。Q 蛋白也是一种抗转录终止因素。晚期操纵子所含的基因数约占基因总数的一半,病毒外壳蛋白的很多结构基因和溶解细菌的酶的基因都位于晚期操纵子上(图16-6)。

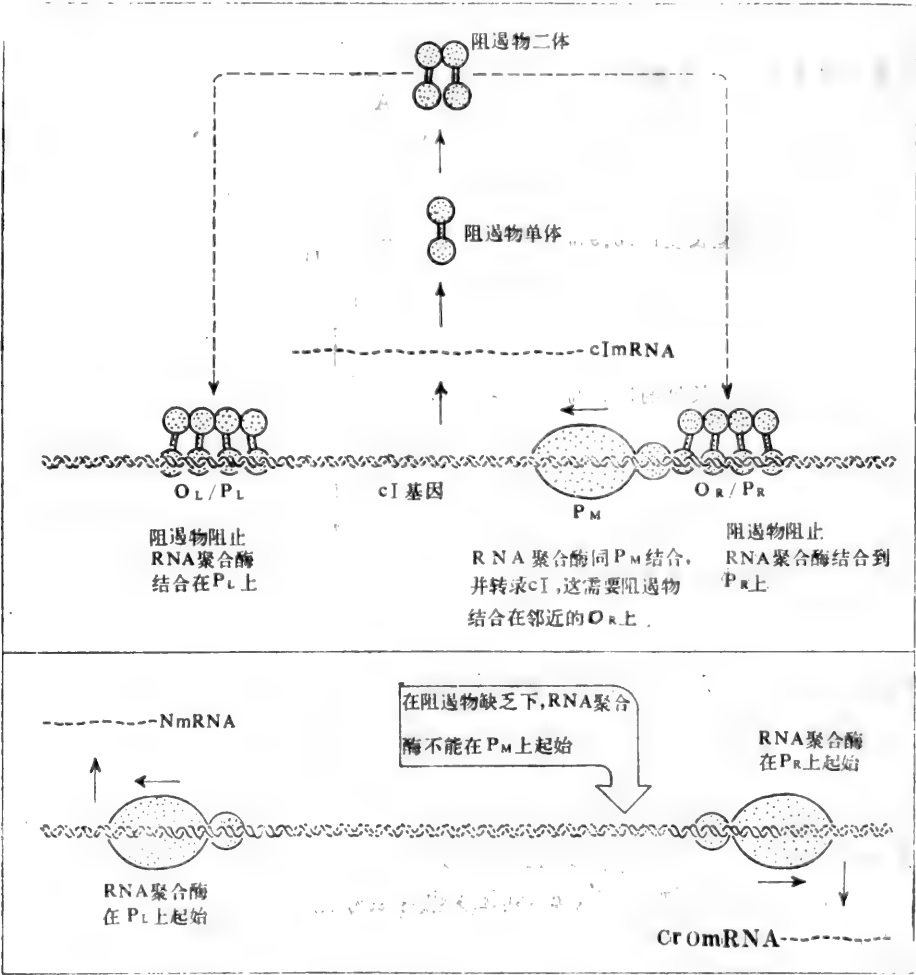


图16—7 溶原性的确定(上)和溶菌周期的发生

λ-DNA 基因组的60% (包括左侧 A—J 等编码头部和尾部的基因以及右侧  $P_R$  至  $cosR$  一段)是噬菌体溶菌增殖所必需的;约占基因组1/3的部分是溶菌生长非必需的,因而可被外源 DNA 片段取代。当被包装在外壳中的 DNA 片段的长度大于野生型基因组的105%或小于野生型基因组的75%时,噬菌体的生存性显著地减少。因此,选择适当长度的外源 DNA 片段与缺失后的 λ-DNA 重组是很重要的。

野生型的 λ-DNA 有五个 EcoR I 作用位点,这是它作为载体的一个缺点。但是该酶的

这五个作用位点位于溶菌生长的非必需部位。它所产生的六个片段(A、B、C、D、E、F)可以在琼脂糖凝胶中电泳分离,并可把片段A同片段D、E和F连接起来。这样就减少了两个作用位点。然后通过突变除去两个作用位点。这样就只剩下一个EcoR I作用位点了。最后除去位于E片段内的非必需的nin 5区段。经过这些步骤的处理,即可得到保留有λ噬菌体溶菌生长以及溶原生长所必需的区段的DNA,这种λ-DNA可以作为载体与外源基因重组(图16-8)。

图16—8 由野生型  $\lambda$ -DNA 衍生而来的  $\lambda$ -DNA 载体 (箭头表示  $EcoR$  I 的作用位点)

除  $\lambda$ -DNA 外, 还有一些病毒 DNA 经过改造后也可作为外源基因的载体。

### 第三节 体外重组

## 一、粘性末端互补法

有许多限制性内切酶作用于 DNA 后，可以产生互补的粘性末端。具有互补粘性末端的 DNA 片段可以退火（annealing）自动连接。利用这种性质，将载体 DNA 用某种限制性内切酶处理后可以和用同一种内切酶处理得到的外源基因片段在适当的条件下混合，互补的粘性末端退火连接，形成重组体（recombinant）分子。

如果是用反向转录法合成的外源基因，可以用  $T_4$  DNA 连接酶接上某种限制性内切酶的识别顺序（这种识别顺序称为“接头”），再将外源基因和载体分别用这种酶切割处理，两者可以产生相同的粘性末端，然后在一定条件下重组，从而形成重组体分子。注意，外源基因中不应含有该限制性内切酶的切点，否则就不能得到含有完整外源基因的重组体。

限制性内切酶法虽然简便，但有缺点。这表现在，载体 DNA 产生粘性末端后可以重新自身退火而恢复原形，或者形成二聚体；另外，外源基因亦可以通过粘性末端形成寡聚体。这样就减少了两种 DNA 片段之间重组的机率。

## 二、dA-dT 法（或 dG-dC 法）

dA-dT 法特别适用于反向转录法合成的基因。因为这样合成的基因不具有限制性内切酶产生的天然的粘性末端。dA-dT 法是利用小牛胸腺末端转移酶（terminal transferase）从 DNA 片段的 3'-OH 端开始将 dATP 或 dTTP 按顺序延伸形成同聚单链尾巴。如果在外源基因的 3'-OH 端接上的是 dAAA...AA 的话，就可以在载体 DNA 的 3'-OH 端接上 dTTT

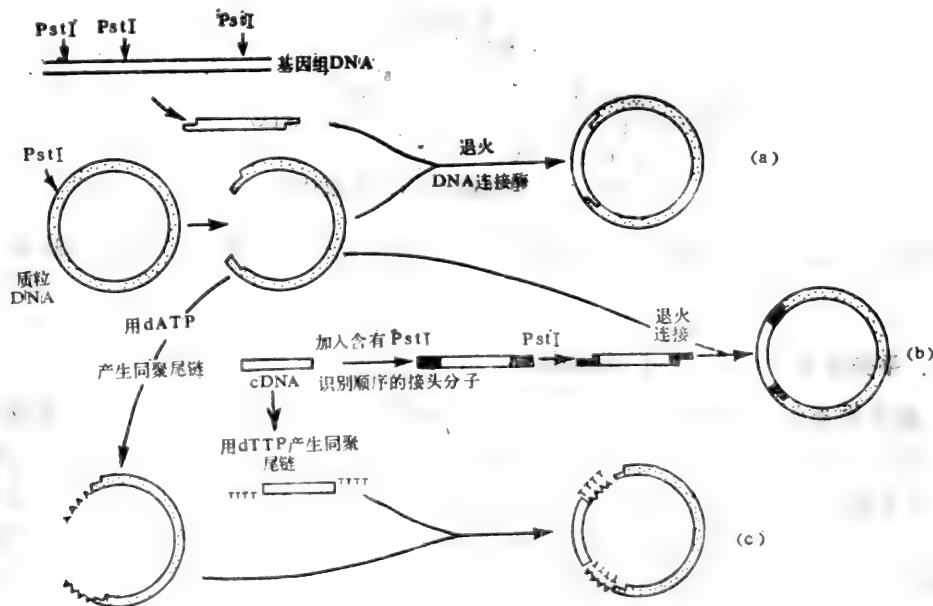


图16-9 外源基因与载体质粒 DNA 重组

(a)限制性内切酶法插入外源基因；(b)平齐末端加“接头”分子将外源基因插入；  
(c)用 dA-dT 法插入外源基因。

...TT。当把具有上述尾链的两种不同的 DNA 片段在一定条件下混合时，按 dA-dT 配对的原则，就可以把二者连接起来形成重组体（图16—9）。这种方法形成重组体分子克服了 DNA 片段的自身环化或聚合的缺点，因而效率高。但是，如果要把外源基因从重组体上重新取下来时，便遇到困难，因为在外源基因的两端没有限制性内切酶的切点。为了克服这个困难，可先在载体 DNA 上用一种限制性内切酶将其切开（注意，该酶不应在 cDNA 上有切点），用 DNA 聚合酶将产生的粘性末端合成双链平齐的末端，然后再用末端转移酶在 3'-OH 端产生单链尾巴。这样，因保留了限制性内切酶的识别顺序，故可以从重组体分子中回收外源基因（图16—10）。

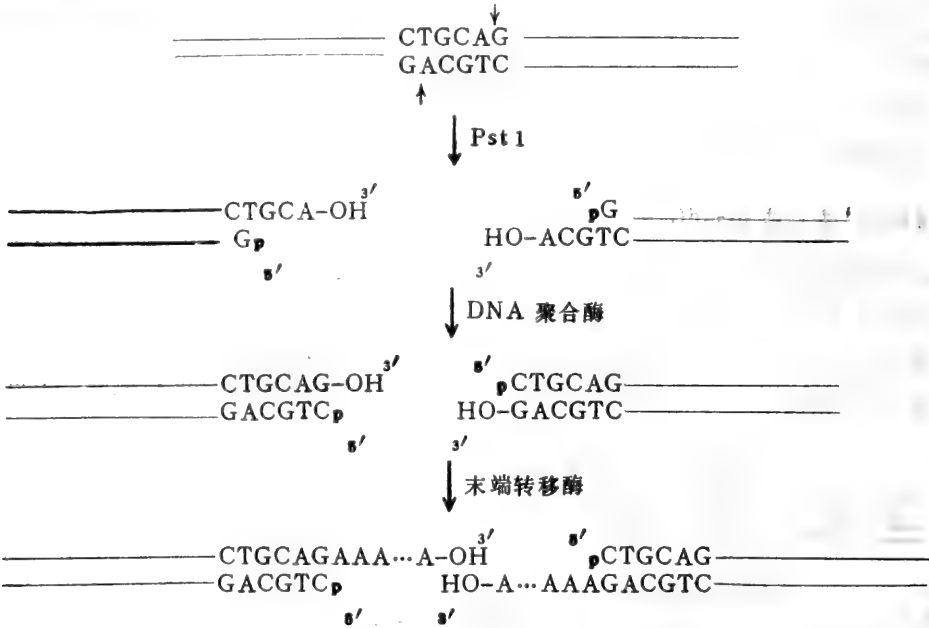


图16—10 可回收 cDNA 的载体

上述两种方法都需要借助 DNA 连接酶形成磷酸二酯键把外源基因和载体 DNA 完全结合起来。

### 三、平齐末端 (Blunt-end) 连接法

T<sub>4</sub>噬菌体感染大肠杆菌后产生的 DNA 连接酶（即 T<sub>4</sub> DNA 连接酶）具有把双链末端平齐（又称钝端）的两种 DNA 片段连接起来的能力，只要末端具有5'-磷酸基。这种连接法的效率是很低的，因为它是靠两个末端正确并列的机会而不是靠二者之间的亲和力来连接的。所以，通常不直接用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶去连接，而是采用接上限制性内切酶的识别顺序（“接头”）的限制性内切酶法或 dA-dT 法来连接外源基因和载体 DNA（图16—9）。

## 第四节 转化和筛选

通过上述方法完成外源基因和载体 DNA 的重组之后，接着需要进行转化 (transfor-

mation)。这就需要适当的受体细菌。转化之后需要进行筛选和鉴定出含有外源基因的无性繁殖系。

### 一、受体细菌

作为重组体分子的受体菌应符合下述要求：

(1) 不含有限制性内切酶。

(2) 经过适当处理后容易使重组体 DNA 进入到细胞中去。

(3) 不应该对环境造成污染，在非培养的条件下不能生存。

在基因工程操作中常用的受体菌是大肠杆菌的某些突变株。大肠杆菌菌株 X1776 是一种很好的受体菌株，每微克的完整的 pBR322 DNA 可产生  $10^7$ — $10^8$  转化细胞 (transformant)。此外，大肠杆菌菌株 C600 亦可作为受体菌。

### 二、转 化

受体细菌在经过  $\text{Ca}^{++}$  简单处理后与重组体分子在低温下混合，重组体分子即可进入到受体细胞内 (即转化)。然后，在一定的条件下进行培养、增殖。这个过程称为克隆，即无性繁殖。通过转化所建立的含有外源重组体分子的菌株或品系就称为无性繁殖系。

### 三、筛 选

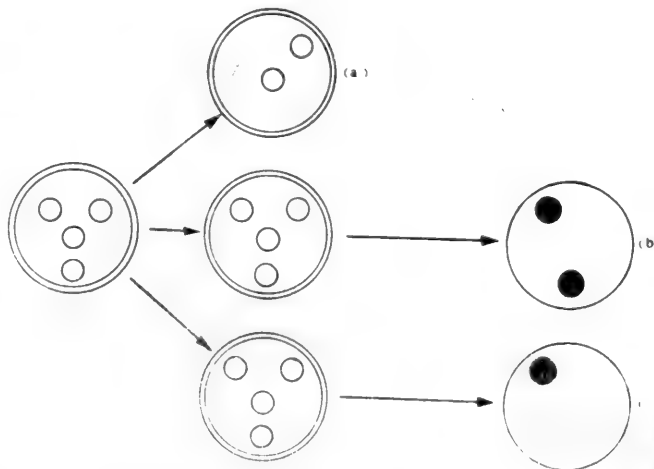
为了筛选、鉴定出含有外源基因的无性繁殖系，首先利用载体 DNA 的特殊基因的功能如药物抗性的丧失、或特异性酶 (例如  $\beta$ -半乳糖苷酶) 的合成丧失进行初步筛选。例如在图 16—9 中，外源基因插入到质粒 pBR322 的氨苄青霉素抗性基因上，若重组和转化都成功，所建立的无性繁殖系不应在含有氨苄青霉素的培养基中生长，但能在含有四环素的培养基中生长。这样可以初步筛选出含有重组体分子的无性繁殖系 (图 16—11(a))。

图 16—11 检测含有外源基因及其表达产物的无性繁殖系

(a) 表示在无性繁殖系中外源基因可能已经插入到载体药物抗性基因上 (左上和 下端的两个菌落)；

(b) 用外源基因的互补探针证明无性繁殖系含有外源基因；

(c) 表示只有左上的无性繁殖系中的外源基因能够表达，产生蛋白质。



在初步筛选的基础上，尚需要进一步鉴定外源基因是否插入到载体 DNA 上。菌落原位

杂交 (in situ hybridization of bacterial colonies) 是常用的方法。这个方法是这样的：将初步筛选出的菌落使其在硝酸纤维素滤片上生长成新的菌落 (细菌可以通过滤片吸收培养基中的营养物)，溶解菌落中的菌体，使菌体中的 DNA 变性，并固定在滤片上，同含有放射性标记的单股 cDNA 或 mRNA 在一定条件下杂交，最后通过放射性自显影技术找出产生了杂交体的菌落。这样就可以鉴定出外源基因是否插入到载体 DNA 上 (图16—11(b))

也可以利用外源基因的表达产物来鉴定外源基因是否 (正确地) 插入到载体 DNA 上。外源基因若通过载体转入到受体细胞中，在适当的条件下是有表达合成蛋白质的可能性的。因此，可以通过外源基因编码的蛋白质是否存在来检测是否插入或正确地插入到载体 DNA 中。一般是用免疫化学法来达到这一目的。首先温和地溶解菌体，以便释放出具有活性的抗原 (即外源基因编码的蛋白质)，随后吸墨在含有能同该蛋白质结合的抗体的聚氯乙烯 (PVC) 塑料薄片上，并加以固定，洗掉非特异结合的物质。然后再同放射性标记 (例如<sup>125</sup>I) 的第二抗体 (即抗-抗体) 起反应，漂洗之后进行放射性自显影，即可找出产生具有免疫化学活性蛋白质的无性繁殖系。该无性繁殖系含有编码该蛋白质外源基因 (图16—11(c))。

也可以用“杂种抑制翻译” (Hybrid arrested translation) 的方法来检测外源基因是否插入到载体上。这个方法特别适用于从多种被克隆的 DNA 中检测所需要的基因是否插入到载体上。首先，从几个无性繁殖系中分离出被克隆的 DNA (即含有外源基因的重载体分子)；然后，分别同最初用作模板合成多种 cDNA 的混合 mRNA 进行杂交。如果被克隆

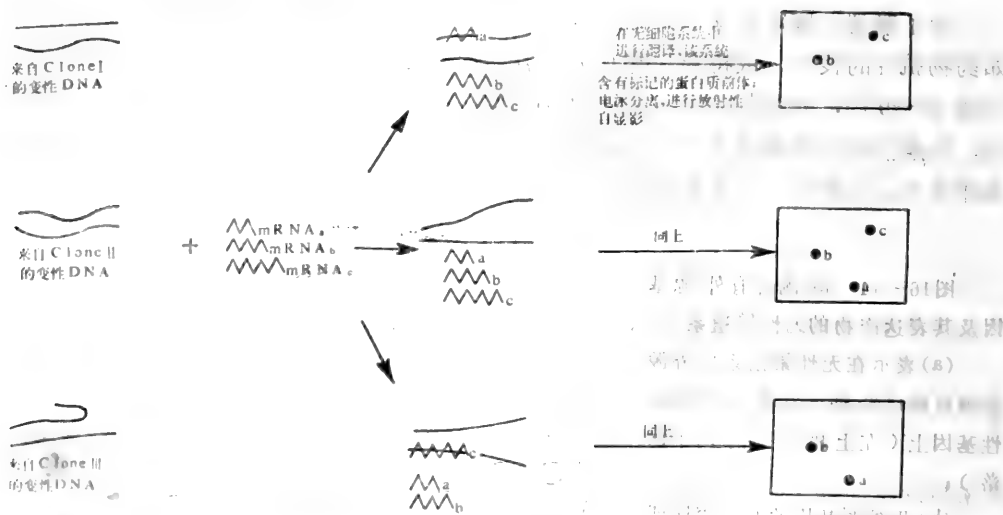


图16—12 “杂种抑制翻译” (HART) 检测法  
 Clone I 携带编码蛋白质 a 的基因; Clone II 携带的基因不编码  
 这三种蛋白质中的任何一种; Clone III 携带编码蛋白质 C 的基因。

的 DNA 同某种 mRNA 杂交，则这种杂种分子就不能作模板在无细胞翻译系统中指导蛋白质的合成。将杂交混合物分别加到无细胞翻译系统中，去指导蛋白质合成，新产生的蛋白质用双向聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。所有不能同被克隆 DNA 杂交的 mRNA，都能指导各自特异的蛋白质合成；同能同被克隆 DNA 杂交的 mRNA 则不能指导相应蛋白质的合成。



利用这个蛋白质的缺失，即可鉴定出哪一个无性繁殖系含有编码该蛋白质的外源基因（图16—12）。

## 第五节 基因工程的应用

### 一、基因文库（Genomic library）

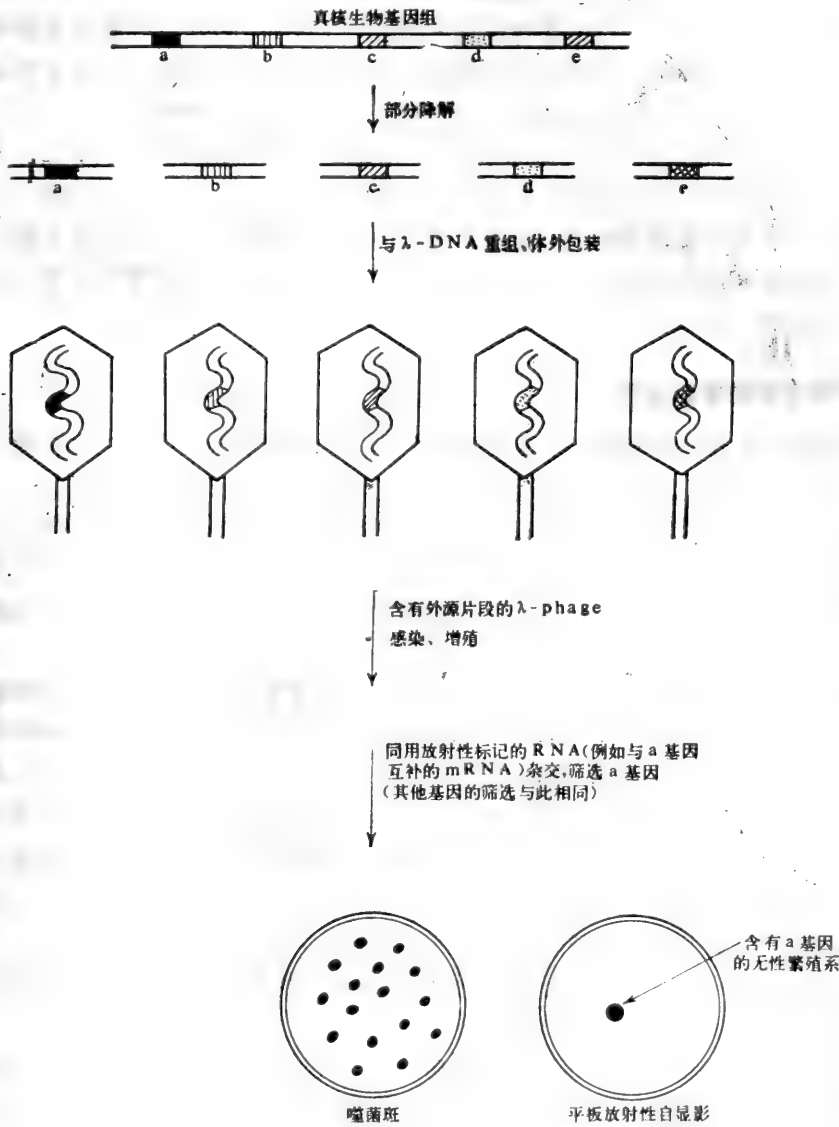


图16—13 基因文库的建立与无性繁殖系的鉴定

真核生物基因组的分析是一个相当难以解决的问题。但现在，重组体 DNA 技术可使真核生物基因插入到细菌中去而使这个问题正逐步得到解决，因为 DNA 体外重组和克隆技术大大地减少了这个问题的复杂性。

首先，使真核生物基因组部分降解，随机产生平均长度约为20,000bp 的片段，接着将人工合成的某种限制性内切酶的识别序（“接头”）接上，产生粘性末端。然后将这些片段同载体例如  $\lambda$ -DNA 连接，形成重组体分子。把这种重组体在体外包装成病毒粒子，并筛选出含有插入物的重组体噬菌体（即含重组体分子的噬菌体）。用这些重组体噬菌体去感染大肠杆菌。所得到的溶菌产物含有真核生物 DNA 的片段，并且已被扩增一百万倍（图16—13）。

上述方法就是通过基因工程的手段将真核生物的 DNA 片段送进大肠杆菌细胞，从而获得许多含不同基因的菌株。当需要对某种基因进行研究时，可以很方便地将含有该基因的菌株进行培养、增殖，从而获得该基因的大量拷贝。这就好比将资料贮存在图书馆中，需要时再取出来。因此，把用基因工程的方法所建立的众多的菌株（无性繁殖系）称为基因文库。

由于可以建立基因文库，因此对于基因的核苷酸顺序分析，以及它所编码的 mRNA 或蛋白质的序列分析都极为有利的。在染色体基因组上直接图解基因的位置也成为可能。特别是对于真核生物的各种信号基因和调节基因的分析 and 鉴定、结构基因内含子的结构和功能的研究等等也提供了很大的方便。

## 二、基因工程的实际应用

DNA 的体外重组和克隆使得许多有特殊用途的蛋白质商品化生产成为可能。有些蛋白质和肽激素已经用基因工程的方法进行了生产。

细菌 DNA 连接酶在基因的生物化学研究中是很有用途的工具酶。把 DNA 连接酶的基因插入到载体上进行克隆可以产生许多拷贝，从而大量地产生这种酶，比正常的大肠杆菌产生的酶高出几百倍。其他在工业上有用的酶或蛋白亦可通过在大肠杆菌或酵母细胞中克隆而大量地生产。

生长激素抑制因子（Somatostatin）是由14个氨基酸残基构成的一种下丘脑肽激素。它调节胰岛素、胰高血糖素和生长激素的分泌。现已人工合成生长激素抑制因子的基因。把它的基因接在乳糖操纵子启动基因-操纵基因区下游的一个适当的位置，即接在  $\beta$ -半乳糖苷酶基因的末端，并把它们重组到质粒 DNA 上，然后导入到大肠杆菌细胞内，在不含葡萄糖而含乳糖的培养基中进行培养、扩增。结果，大肠杆菌细胞便大量地制造出杂种蛋白， $\beta$ -半乳糖苷酶和生长激素抑制因子共价相连。这种杂种蛋白称为嵌合体蛋白（Chimeric protein）。 $\beta$ -半乳糖苷酶-生长激素抑制因子嵌合体可在两者相连的肽键上用溴化氰断裂，产生具有生物活性的生长激素抑制因子。这里，乳糖操纵子的启动基因-操纵基因的接入是为了更好地更有效地启动外源基因的转录（图16—14）。

人胰岛素基因的基因工程操作已获得成功，可以通过大肠杆菌大量地产生胰岛素。

干扰素（Interferons）是一类由病毒感染脊椎动物后由某些细胞产生的糖蛋白。干扰素的功能是干扰病毒的增殖。干扰素最有意义的特性之一是，它们是宿主细胞专一的，而不是病毒专一的。这就是说，由人体细胞产生的干扰素只保护人体细胞，而对其他种族的动物细胞则很少有抗病毒活性。但是，一种动物产生的干扰素却可以抗许多不同种类的病毒。不

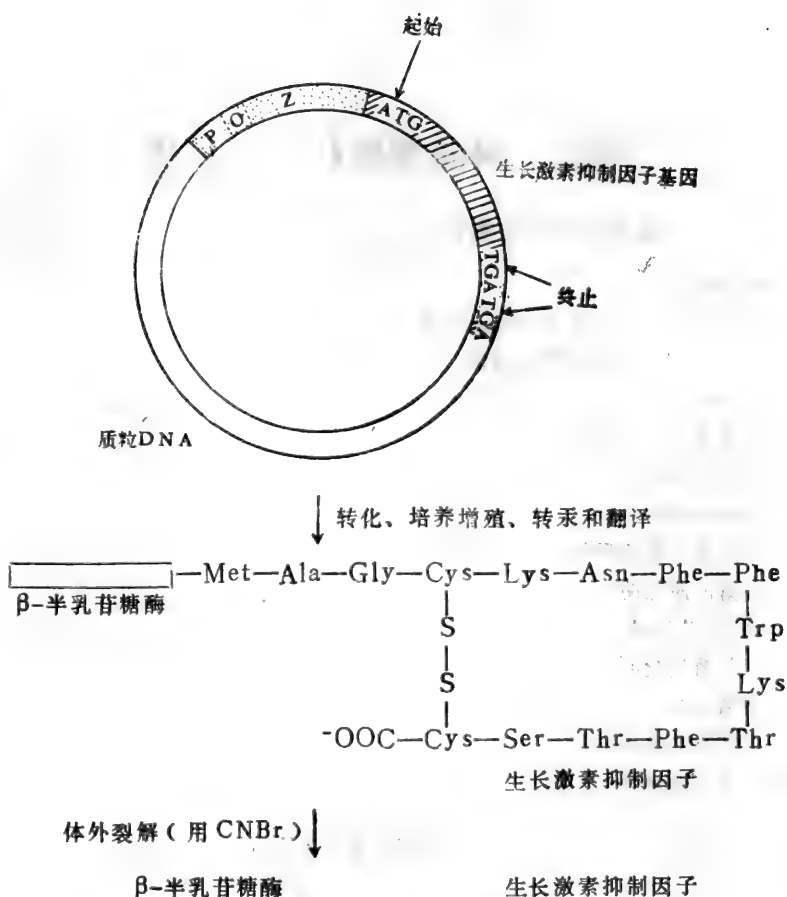


图16—14 基因工程法生产生长激素抑制因子

仅不同种类动物产生不同的干扰素，而且同一种动物的不同类型的细胞产生的干扰素也不相同：一种是由结缔组织的成纤维细胞产生的，一种是由白血球细胞产生的，第三种是由T淋巴细胞产生的。这三种不同的干扰素对身体所起的作用可能有些微小的差别。

被感染的宿主细胞产生的干扰素很少，它们可被感染的细胞释放出来，扩散到邻近未感染的细胞，在那儿发挥它们的抗病毒作用。干扰素结合到未感染细胞的表面，并以某种方式诱导这些细胞产生另一种抗病毒蛋白。这种新合成的蛋白质保留在细胞内，并起阻止病毒核酸合成的作用。

由于干扰素具有上述作用特性，人们自然希望干扰素能在治疗病毒病，特别是在治疗由病毒引起的癌症方面发挥奇特的功效。因此，1980年，瑞士和美国的科学家分离出了编码人白血球细胞干扰素的基因，并成功地组合到质粒上进行了克隆，获得了干扰素。尽管干扰素在治疗癌症方面是否有效还不肯定，但是在这方面的进展可能会使人们对病毒病的认识进入一个新的时代。

我国的基因工程研究虽然晚了些，但是近几年在这方的成绩是引人注目的。在胰岛素、干扰素等方面的基因工程研究中都获得了可喜的成功。现在，我国已有一批相当有水平的基因工程专家正从事多方面的研究工作，相信在不长的时间内会有一批新成果问世。

## 附录 酶的编号和分类简表

| 编号        | 酶作用的反应类型                                                                                                       |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.        | 氧化还原酶                                                                                                          |
| 1.1       | 以 $>\text{CHOH}$ 为供体的氧化还原酶                                                                                     |
| 1.1.1     | 以 $\text{NAD}^+$ 或 $\text{NADP}^+$ 为受体                                                                         |
| 1.1.1.1   | 醇脱氢酶                                                                                                           |
| 1.1.1.2   | 醇脱氢酶 ( $\text{NADP}^+$ )                                                                                       |
| 1.1.1.6   | 甘油脱氢酶                                                                                                          |
| 1.1.1.27  | 乳酸脱氢酶                                                                                                          |
| 1.1.2     | 以细胞色素为受体                                                                                                       |
| 1.1.2.2   | 甘露醇脱氢酶                                                                                                         |
| 1.1.3     | 以 $\text{O}_2$ 为受体                                                                                             |
| 1.1.3.4   | 葡萄糖氧化酶                                                                                                         |
| 1.1.3.13  | 醇氧化酶                                                                                                           |
| 1.1.99    | 以其它为受体的酶                                                                                                       |
| 1.1.99.16 | 苹果酸脱氢酶 (受体)                                                                                                    |
| 1.2       | 以 $-\text{C} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H} \end{array}$ 或 $-\text{C}=\text{O}$ 基为供体的氧化还原酶 |
| 1.2.1     | 以 $\text{NAD}^+$ 或 $\text{NADP}^+$ 为受体                                                                         |
| 1.2.1.3   | 醛脱氢酶                                                                                                           |
| 1.2.1.4   | 醛脱氢酶 ( $\text{NADP}^+$ )                                                                                       |
| 1.2.1.5   | 醛脱氢酶 ( $\text{NAD(P)}^+$ )                                                                                     |
| 1.2.1.9   | 磷酸甘油醛脱氢酶 ( $\text{NADP}^+$ )                                                                                   |
| 1.2.1.11  | 门冬氨酸半醛脱氢酶                                                                                                      |
| 1.2.1.41  | 谷氨酸半醛脱氢酶                                                                                                       |
| 1.2.2     | 以细胞色素为受体                                                                                                       |
| 1.2.2.2   | 丙酮酸脱氢酶 (细胞色素)                                                                                                  |
| 1.2.3     | 以氧为受体                                                                                                          |
| 1.2.3.1   | 醛氧化酶                                                                                                           |
| 1.2.3.2   | 黄嘌呤氧化酶                                                                                                         |
| 1.2.3.5   | 乙醛酸氧化酶                                                                                                         |
| 1.2.4     | 以二硫化合物为受体                                                                                                      |
| 1.2.4.1   | 丙酮酸脱氢酶 (硫辛酰胺)                                                                                                  |
| 1.2.7     | 以铁硫蛋白为受体                                                                                                       |
| 1.2.7.1   | 丙酮酸合酶                                                                                                          |
| 1.2.7.3   | $\alpha$ -酮戊二酸合酶                                                                                               |

- 1.2.99 以其它为受体
  - 1.2.99.1 尿嘧啶脱氢酶
- 1.3 以  $-\text{CH}-\text{CH}-$  为供体
  - 1.3.1 以  $\text{NAD}^+$  或  $\text{NADP}$  为受体
    - 1.3.1.8 酰基—CoA 脱氢酶
    - 1.3.1.10 烯脂酰—ACP 还原酶 ( $\text{NADPH}$ )
    - 1.3.1.14 乳清酸还原酶
    - 1.3.1.21 7-脱氢胆固醇还原酶
  - 1.3.2 以细胞色素为受体
    - 1.3.2.3 半乳糖酸内酯脱氢酶
  - 1.3.3 以氧为受体
    - 1.3.3.1 二氢乳清酸氧化酶
    - 1.3.3.2 羊毛固醇氧化酶
- 1.3.99 以其它为受体
  - 1.3.99.1 琥珀酸脱氢酶
- 1.4 以  $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$  为供体
  - 1.4.1 以  $\text{NAD}^+$  或  $\text{NADP}^+$  为受体
    - 1.4.1.2 谷氨酸脱氢酶
    - 1.4.1.3 谷氨酸脱氢酶 ( $\text{NAD(P)}^+$ )
    - 1.4.1.7 丝氨酸脱氢酶
  - 1.4.3 以  $\text{O}_2$  为受体
    - 1.4.3.2 L-氨基酸氧化酶
  - 1.4.7 以铁硫蛋白为受体
    - 1.4.7.1 谷氨酸合酶 (铁氧还蛋白)
- 1.5 作用于供体  $-\text{CH}-\text{NH}-$ 
  - 1.5.1 以  $\text{NAD}$  或  $\text{NADP}$  为受体
    - 1.5.1.3 四氢叶酸脱氢酶
    - 1.5.1.7 酵母氨酸脱氢酶 ( $\text{NAD}^+$ , L-Lys 形成)
  - 1.5.3 以  $\text{O}_2$  为受体
    - 1.5.3.1 肌氨酸氧化酶
- 1.6 以  $\text{NADH}$  或  $\text{NADPH}$  为供体
  - 1.6.2.2 细胞色素  $b_5$  还原酶
  - 1.6.2.4  $\text{NADPH}$ —细胞色素还原酶
  - 1.6.4 以二硫化合物为受体
    - 1.6.4.1 胱氨酸还原酶
    - 1.6.4.2 谷胱甘肽二硫化物还原酶 ( $\text{NAD(P)H}$ )
  - 1.6.6 以含 N 基团为受体
    - 1.6.6.1 硝酸盐还原酶 ( $\text{NADH}$ )
    - 1.6.6.2 硝酸盐还原酶 ( $\text{NAD(P)H}$ )
    - 1.6.6.4 亚硝酸还原酶 ( $\text{NAD(P)H}$ )
  - 1.6.99 以其它为受体

- 1.6.99.5 NADH 脱氢酶(醌)
- 1.6.99.5 NAD(P)H脱氢酶(醌)
- 4.7 以其它含 N 化合物为供体
  - 1.7.2 以细胞色素为受体
    - 1.7.2.1 亚硝酸还原酶(细胞色素)
  - 1.7.3 以  $O_2$  为受体
    - 1.7.3.3 尿酸氧化酶
- 1.8 以含硫基因为供体
  - 1.8.3 以  $O_2$  为受体
    - 1.8.3.2 硫醇氧化酶
  - 1.8.5 以醌或相关化合物为受体
    - 1.8.5.1 谷胱甘肽脱氢酶(抗坏血酸)
- 1.9 以血红素为供体
  - 1.9.3 以  $O_2$  为受体
    - 1.9.3.1 细胞色素氧化酶
- 1.10 以二酚及相关化合物为供体
  - 1.10.2 以细胞色素为受体
    - 1.10.2.2 泛醌—细胞色素 C 还原酶
  - 1.10.3 以氧为受体
    - 1.10.3.3 抗坏血酸氧化酶
- 1.11 以  $H_2O_2$  作受体
  - 1.11.1 只有一个亚—亚类含过氧化物酶
    - 1.11.1.3 脂肪酸氧化酶
- 1.13 作用于一单个供体, 并参与分子氧(加氧酶)
  - 1.13.11 参与两个氧原子
    - 1.13.11.11 色氨酸-2, 3—二加氧酶
    - 1.13.11 4-羟苯丙酮酸二加氧酶
  - 1.13.12 参与一个氧原子(内单加氧酶或内混合功能氧化酶)
    - 1.13.12.3 色氨酸—2—单加氧酶
- 1.14 作用于一对供体, 并参与氧分子
  - 1.14.13 以 NADH 或 NADPH 为一个供体并参与一个氧原子
    - 1.14.13.3 4-羟苯乙酸-3-单加氧酶
    - 1.14.13.7 苯酚-2-单加氧酶
    - 1.14.13.14 反-苯丙烯酸-2-单加氧酶
  - 1.14.17 以抗坏血酸作一个供体并参与一个氧原子
    - 1.14.17.1 多巴胺单加氧酶
- 1.15 作用于超氧自由基作受体(只有一个酶)
  - 1.15.1.1 超氧化物歧化酶
- 1.16 以金属离子为供体(氧化成高价金属离子)
  - 1.16.3 以氧为受体(只有这一个亚—亚类)
- 1.17 以  $-CH_2-$  为供体被酶氧化成  $-CHOH-$

- 1.17.1 以 NAD(P)<sup>+</sup> 为受体
- 1.17.1.1 CDP-4-酮-6-脱氧 D-葡萄糖还原酶
- 1.17.4 以二硫化物为受体
  - 1.17.4.1 核糖核苷二磷酸还原酶
  - 1.17.42 核糖核苷三磷酸还原酶
- 1.18 以还原型铁氧还蛋白为供体
  - 1.18.2 以二氮作受体
    - 1.18.2.1 固氮酶
  - 1.18.3 以氢为受体
    - 1.18.3.1 氢酶
- 1.19 以还原型黄氧还蛋白为供体
  - 1.19.2 以二氮为受体
    - 1.19.2.1 固氮酶(黄氧还蛋白)
- 2. 转移酶类
- 2.1 转一碳基团酶
  - 2.1.1 甲基转移酶
    - 2.1.1.10 高半胱氨酸甲基转移酶
    - 2.1.1.45 胸苷酸合酶
  - 2.1.2 羟甲基、甲酰基及相关物的转移酶
    - 2.1.2.1 丝氨酸羟甲基转移酶
    - 2.1.2.2 磷酸核糖甘氨酸胺甲酰转移酶
  - 2.1.3 羧基、和氨甲酰基转移酶
    - 2.1.3.1 甲基丙二酰-CoA 羧基转移酶
    - 2.1.3.2 门冬氨酸氨甲酰转移酶
    - 2.1.33 鸟氨酸氨甲酰转移酶
  - 2.1.4 脒基转移酶
    - 2.1.4.1 甘氨酸脒基转移酶
- 2.2 转醛基和酮基的酶
  - 2.2.1 只有一个亚一类包含转酮酶和转醛酶
    - 2.2.1.1 转酮酶
    - 2.2.1.2 转醛酶
- 2.3 转酰基酶
  - 2.3.1 酰基转移酶
    - 2.3.1.9 乙酰-CoA 乙酰转移酶
    - 2.3.1.16 乙酰-CoA 酰基转移酶
    - 2.3.1.22 酰基甘油软脂酰基转移酶
  - 2.3.2 氨酰转移酶
    - 2.3.2.7 门冬氨酸转移酶
    - 2.3.2.12 肽酰转移酶
- 2.4 糖基转移酶
  - 2.4.1 己糖基转移酶

|          |                           |  |           |
|----------|---------------------------|--|-----------|
| 2.4.1.1  | 磷酸化酶                      |  | 1.1.1     |
| 2.4.1.14 | 蔗糖磷酸合酶                    |  |           |
| 2.4.1.29 | 纤维素合酶(GDP 形成)             |  |           |
| 2.4.2    | 戊糖基转移酶                    |  |           |
| 2.4.2.17 | ATP 磷酸核糖转移酶               |  | 2.7.1.1   |
| 2.5      | 转甲基以外的烷基及芳基               |  | 1.1.1     |
| 2.5.1    | 这亚类只有这一个亚-亚类              |  |           |
| 2.5.1.1  | 二甲基乙烯基转移酶                 |  | 1.8.81.1  |
| 2.6      | 含氮基团转移酶                   |  |           |
| 2.6.1    | 转氨酶                       |  |           |
| 2.6.1.2  | 谷丙转氨酶                     |  | 1.1.1     |
| 2.6.1.6  | 亮氨酸转氨酶                    |  |           |
| 2.7      | 转移含磷酸基团的酶                 |  |           |
| 2.7.1    | 以一醇基为受体的磷酸转移酶             |  |           |
| 2.7.1.1  | 己糖激酶                      |  |           |
| 2.7.1.20 | 腺苷激酶                      |  | 1.1.1.5   |
| 2.7.2    | 以羧基为受体的磷酸转移酶              |  | 0.1.1.1.5 |
| 2.7.2.2  | 氨甲酸激酶                     |  |           |
| 2.7.2.3  | 磷酸甘油酸激酶                   |  | 1.1.1     |
| 2.7.2.4  | 门冬氨酸激酶                    |  | 1.1.1.5   |
| 2.7.3    | 以含氨基为受体的磷酸转移酶             |  | 1.1.1     |
| 2.7.3.2  | 肌酸激酶                      |  | 1.1.1     |
| 2.7.4    | 以磷酸基团为受体的磷酸转移酶            |  | 1.1.1.5   |
| 2.7.4.3  | 腺苷酸激酶                     |  | 1.1.1.5   |
| 2.7.4.9  | dTMP 激酶                   |  | 1.1.1     |
| 2.7.5    | 催化分子内部磷酸基的转移              |  | 1.1.1     |
| 2.7.5.1  | 磷酸葡萄糖变位酶                  |  | 1.1.1     |
| 2.7.5.3  | 磷酸甘油变位酶                   |  | 1.1.1     |
| 2.7.6    | 二磷酸转移酶                    |  | 1.1.1     |
| 2.7.6.2  | 硫酸素焦磷酸激酶                  |  | 1.1.1.5   |
| 2.7.6.4  | 核苷酸焦磷酸激酶                  |  | 1.1.1.5   |
| 2.7.7    | 核苷酰转移酶                    |  | 1.1.1     |
| 2.7.7.1  | NMN 腺苷酰转移酶                |  | 1.1.1     |
| 2.7.7.2  | FMN 腺苷酰转移酶                |  | 1.1.1.5   |
| 2.7.8    | 其它取代磷酸基团的转移酶              |  | 1.1.1.5   |
| 2.7.8.2  | 胆碱磷酸转移酶                   |  | 1.1.1.5   |
| 2.7.8.8  | 磷脂酰丝氨酸合酶                  |  |           |
| 2.7.9    | 带成对受体的磷酸转移酶               |  |           |
| 2.7.9.2  | 丙酮酸, H <sub>2</sub> O 二激酶 |  | 1.1.1.5   |
| 2.9      | 含硫基团转移酶                   |  |           |
| 2.8.2    | 转硫基的酶                     |  |           |



- 2.8.2.5 软骨素硫酸转移酶
- 2.8.3 CoA 转移酶
  - 2.8.3.3 丙二酰—CoA 转移酶
- 3. 水解酶类
  - 3.1 作用于酯键
    - 3.1.1 催化羧酯水解
      - 3.1.1.3 三酰甘油脂肪酶
      - 3.1.1.7 乙酰胆碱酯酶
      - 3.1.1.29 氨酰—tRNA 水解酶
    - 3.1.2 硫酸酯水解酶
      - 3.1.2.1 乙酰—CoA 水解酶
      - 3.1.2.3 琥珀—CoA 水解酶
    - 3.1.3 磷酸单酯水解酶
      - 3.1.3.1 碱性磷酸酯酶
      - 3.1.3.4 磷脂酸磷酸酶
    - 3.1.4 磷酸二酯水解酶
      - 3.1.4.3 磷脂酶 C
      - 3.1.4.4 磷脂酶 D
      - 3.1.4.11 三磷酸肌醇磷酸二酯酶
    - 3.1.5 三磷酸单酯水解酶
      - 3.1.5.1 dGTPase
    - 3.1.6 硫酸酯水解酶
      - 3.1.6.1. 软骨素—6—硫酸酯酶
    - 3.1.11 形成—5'—磷酸单酯的外切脱氧核糖核酸酶
      - 3.1.11.1 外切脱氧核糖核酸酶 I
      - 3.1.11.2 外切脱氧核糖核酸酶 III
    - 3.1.13 产生—5'—磷酸单酯的外切核糖核酸酶
      - 3.1.13.3 寡核苷酸酶
    - 3.1.21 产生—5'—磷酸单酯的内切脱氧核糖核酸酶
      - 3.1.21.1 脱氧核糖核酸酶 I
    - 3.1.23 部位专一性内切脱氧核糖核酸酶：序列专一性切割
      - 3.1.23.13 内切脱氧核糖核酸酶 EcoRI
      - 3.1.23.21 内切脱氧核糖核酸酶 HindIII
    - 3.1.26 产生—5'—磷酸单酯的内切核糖核酸酶
      - 3.1.26.3 核糖核酸酶 III
      - 3.1.26.5 核糖核酸酶 P
    - 3.1.27 产生5'—磷酸单酯以外的内切核糖核酸酶
      - 3.1.27.3 核糖核酸酶 T<sub>1</sub>
      - 3.1.27.5 核糖核酸酶（胰）
    - 3.1.30 产生5'—磷酸单酯，对核糖和脱氧核糖都有活性的内切核酸酶
      - 3.1.30.1 内切核酸酶 S, (Aspergillus)

|           |                  |  |
|-----------|------------------|--|
| 3.2       | 作用于糖苷化合物         |  |
| 3.2.1     | 水解O--糖苷化合物       |  |
| 3.2.1.1   | $\alpha$ -淀粉酶    |  |
| 3.2.1.2   | $\beta$ -淀粉酶     |  |
| 3.2.1.4   | 纤维素酶             |  |
| 3.2.1.17  | 溶菌酶              |  |
| 3.2.2     | 水解N-糖苷化合物        |  |
| 3.2.2.1   | 核苷酶              |  |
| 3.2.3     | 水解硫糖苷化合物         |  |
| 3.2.3.1   | 硫代葡萄糖苷酶          |  |
| 3.3       | 作用于醚键            |  |
| 3.3.1     | 硫醚水解酶            |  |
| 3.3.1.1   | 腺苷高半胱氨酸酶         |  |
| 3.4       | 作用于肽键(肽水解酶)      |  |
| 3.4.11    | $\alpha$ -氨酰肽水解酶 |  |
| 3.4.11.1  | 氨肽酶              |  |
| 3.4.11.17 | 门冬氨酸氨肽酶          |  |
| 3.4.13    | 二肽水解酶            |  |
| 3.4.13.11 | 二肽酶              |  |
| 3.4.16    | 丝氨酸羧肽酶           |  |
| 3.4.16.1  | 羧肽酶              |  |
| 3.4.17    | 金属羧肽酶            |  |
| 3.4.17.1  | 羧肽酶A             |  |
| 3.4.17.2  | 羧肽酶B             |  |
| 3.4.21    | 丝氨酸蛋白酶           |  |
| 3.4.21.1  | 胰凝乳蛋白酶           |  |
| 3.4.21.4  | 胰蛋白酶             |  |
| 3.4.22    | 硫醇蛋白酶            |  |
| 2.4.22.3  | 木瓜蛋白酶            |  |
| 3.3.23    | 羧基蛋白酶(酸性)        |  |
| 3.4.23.1  | 胃蛋白酶A            |  |
| 3.5       | 作用肽键以外的C—N键      |  |
| 3.5.1     | 作用于线性酰胺          |  |
| 3.5.1.1   | 门冬酰胺酶            |  |
| 3.5.1.2   | 谷酰胺酶             |  |
| 3.5.2     | 作用于环酰胺           |  |
| 3.5.2.3   | 二氢乳清酸酶           |  |
| 3.5.3     | 作用于线性脘           |  |
| 3.5.3.1   | 精氨酸酶             |  |
| 3.5.4     | 作用于环状脘           |  |
| 5.5.4.6   | AMP脱氨酶           |  |

- 3.6 作用于酸酐
  - 3.6.1 作用于含磷酸酐
    - 3.6.1.1 无机磷焦磷酸酶
    - 3.6.1.3 腺苷三磷酸酶
- 3.7 作用于 C—C 键
  - 3.7.1 作用于含酮物质
    - 3.7.1.1 草酰乙酸酶
- 3.8 作用于卤化物
  - 3.8.1 作用于 C—X 化合物
  - 3.8.2 作用于 P—X 化合物
- 3.9 作用于磷—氮键
- 3.10 作用于硫—氮键
- 3.11 作用于 C—P 键
- 4. 裂合酶类
  - 4.1 C—C 裂合酶
    - 4.1.1 羧基裂合酶
      - 4.1.1.1 丙酮酸脱羧酶
      - 4.1.1.3 草酰乙酸脱羧酶
      - 4.1.1.15 谷氨酸脱羧酶
      - 4.1.1.22 组氨酸脱羧酶
    - 4.1.2 醛裂合酶
      - 4.1.2.5 丝氨酸醛缩酶
      - 4.1.2.13 果糖二磷酸醛缩酶
  - 4.1.3 含氧(酮)酸裂合酶
    - 4.1.3.7 柠檬酸(Si)合酶(CoA)
- 4.2 碳—氧裂合酶
  - 4.2.1 水裂合酶
    - 4.2.1.2 延胡索酸酶
    - 4.2.1.3 乌头酸水合酶
    - 4.2.1.17 烯甘酰水合酶
  - 4.2.2 作用于多糖
    - 4.2.2.8 肝素裂合酶
    - 4.2.2.10 果胶裂合酶
  - 4.2.99 其它碳氧裂合酶
    - 4.2.99.2 苏氨酸合酶
- 4.3 碳—N 裂合酶
  - 4.3.1 氮裂合酶
    - 4.3.1.1 门冬氨酸氮裂合酶
  - 4.3.2 咪裂合酶
    - 4.3.2.1 精氨酸琥珀酸裂合酶
    - 4.3.2.2 腺苷酰琥珀酸裂合酶

- 4.4 C—S键裂合酶(消去  $H_2S$  或代入  $H_2S$ )
- 4.5 C—卤键裂合酶
- 4.6 P—O键裂合酶
  - 4.6.1.1 腺苷酸环化酶
  - 4.6.1.2 鸟苷酸环化酶
- 5. 异构酶类
  - 5.1 消旋酶和表异构酶
    - 5.1.1 作用于氨基酸及其衍生物
      - 5.1.1.1 丙氨酸消旋酶
      - 5.1.1.8 羟脯氨酸表异构酶
    - 5.1.2 作用于羧酸及其衍生物
      - 5.1.2.1 乳酸消旋酶
      - 5.1.2.5 酒石酸表异构酶
    - 5.1.3 作用于糖及其衍生物
      - 5.1.3.2 UDP 葡萄糖—4—表异构酶
      - 5.1.3.3 醛糖—1—表异构酶
  - 5.2 催化顺反异构化的酶
    - 5.2.1.1 脱水苹果酸异构酶
    - 5.2.1.3 视黄醇异构酶
  - 5.3 催化分子内的氧化还原反应
    - 5.3.1 催化醛、酮糖的相互转变
      - 5.3.1.1 磷酸丙糖异构酶
      - 5.3.1.7 甘露糖异构酶
      - 5.3.1.20 核糖异构酶
    - 5.3.2 催化酮式和烯醇式互变的酶
      - 5.3.2.1 苯丙酮酸互变异构酶
      - 5.3.2.2 草酰乙酸互变异构酶
    - 5.3.3 催化双键移位
      - 5.3.3.5 胆固醇  $\Delta^1$ -异构酶
  - 5.4 分子内转移酶
    - 5.4.1 催化酰基转移反应
      - 5.4.1.1 溶血磷脂酰基变位酶
    - 5.4.2 催化磷脂酰基变位酶
      - 5.4.2.1 磷酸甘油磷酸变位酶
    - 5.4.3 催化— $NH_2$  转移
      - 5.4.3.2 Lys—2,3—氨基变位酶
    - 5.4.99 催化其它基团转移
      - 5.4.99.2 甲基丙二酰—CoA变位酶
  - 5.5 分子内的裂合酶
    - 5.5.1.1 己二烯二酸环异构酶
- 5.99 其它异构酶

- 6. 连接酶类(合成酶类)
  - 6.1 形成碳—氧键
    - 6.1.1 形成氨酰—tRNA 及类似物的连接酶
      - 6.1.1.2 酪氨酰—tRNA 合成酶
      - 6.1.1.6 赖氨酰—tRNA 合成酶
  - 6.2 形成 C—S 键
    - 6.2.1 酰—硫醇连接酶
      - 6.2.1.1 乙酰—CoA 合成酶
      - 6.2.1.3 酰基—CoA 合成酶
      - 6.2.1.4 琥珀酰—CoA 合成酶(GDP 形成)
  - 6.3 形成 C—N 键
    - 6.3.1 酸—氨(或胺)连接酶(酰胺合成酶)
      - 6.3.1.1 门冬酰胺合成酶
      - 6.3.1.2 谷酰胺合成酶
    - 6.3.2 酸—氨基酸连接酶(肽合成酶)
      - 6.2.2.2  $\gamma$ -谷氨酰—半胱氨酸合成酶
      - 6.2.2.3 谷胱甘肽合成酶
    - 6.3.3 环连接酶
      - 6.3.3.2 N—5, 10—甲川四氢叶合成酶
    - 6.3.4 其它碳—氮连接酶
      - 6.3.4.1 GMP 合成酶
      - 6.3.4.4 腺苷酸琥珀酸合成酶
      - 6.3.4.5 精氨酸琥珀酸合成酶
      - 6.3.4.7 5'-磷酸核糖胺合成酶
    - 6.3.5 以谷酰胺为酰胺—N 供体的其它 C—N 连接酶
      - 6.3.5.1 NAD<sup>+</sup> 合成酶(谷酰胺水解)
      - 6.3.5.3 磷酸核糖甲酰甘氨酸合成酶
      - 6.3.5.5 氨甲酰磷酸合成酶(谷酰胺水解)
  - 6.4 形成 C—C 键, 这些酶为羧化酶, 大部分为生物素蛋白, 只有一个亚—亚类
    - 6.4.1.1 丙酮酸羧化酶
    - 6.4.1.2 乙酰—CoA 羧化酶
  - 6.5 形成磷酸酯键, 这些酶恢复在核酸中切断的磷酸二酯键
    - 6.5.1.1 聚脱氧核苷酸合成酶(ATP)
    - 6.5.1.2 聚脱氧核苷酸合成酶(NAD<sup>+</sup>)
    - 6.5.1.3 聚核糖核苷酸合成酶(ATP)

1.0

1.0

1.0

1.0

2.0

1.0

1.0

1.0

1.0

1.0

1.0

1.0

1.0

1.0

1.0

1.0

1.0

1.0

1.0

1.0

1.0

1.0

1.0

1.0

1.0

1.0

1.0

1.0

1.0

1.0

1.0

1.0

1.0

1.0

1.0

1.0

1.0

1.0

1.0

1.0

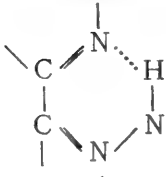
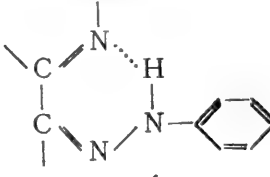
1.0

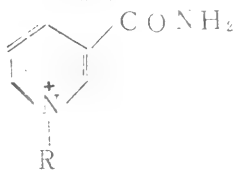
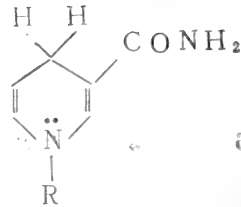
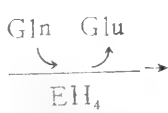
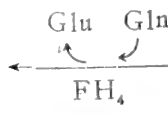
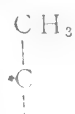
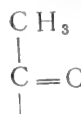
1.0

1.0

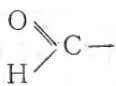
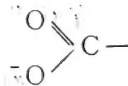
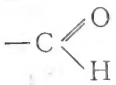
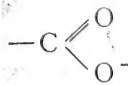
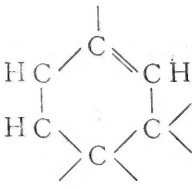
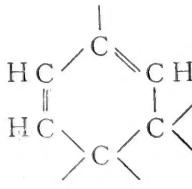
1.0

## 《生物化学》正误表

| 页 数 | 行 数         | 误                                                                                        | 正                                                                                                     |
|-----|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1   | 15          | 各种多糖                                                                                     | 各种粘多糖                                                                                                 |
| 2   | 6           | 糖完成相同                                                                                    | 糖完全相同                                                                                                 |
| 6   | 中间的糖结构      | $\text{OCH}_2\text{OH}$                                                                  | $\text{CH}_2\text{OH}$                                                                                |
| 8   | 中间公式        | I, I                                                                                     | L                                                                                                     |
| 11  | 1           | 肝腔                                                                                       | 肝肠                                                                                                    |
| 14  | 第二个反应式左侧    |         |                     |
| 16  | 最下面左侧结构式    | $\text{OH}_3-\text{CH}-\text{COO}$<br>GlaNAC<br>羧                                        | $\text{CH}_3-\text{CH}-\text{COOH}$<br>GalNAC<br>羧                                                    |
| 25  | 17          | $-(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$                                                            | $-(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$                                                                         |
| 28  | 9, 字 6      | $\text{O}^\ominus$                                                                       | $\text{O}^\ominus$                                                                                    |
| 30  | 表2-1, 结构15格 | $-\text{O}-\text{C}-\text{R}$                                                            | $-\text{O}-\text{C}-\text{R}$                                                                         |
| 35  | 第一排反应式右侧    | $-\text{O}-\text{C}-\text{R}$                                                            | $-\text{O}-\text{C}-\text{R}$                                                                         |
| 36  | 最下面右侧反应     | $-\text{CHR}' + \text{R}''\text{O} + \text{烷氧基} + \text{O}_2$<br>$\text{O}^\bullet$ (部分) | $-\text{CHR}'$ (烷氧基)<br>$\text{O}^\bullet$<br>$\text{R}''\text{O}^\bullet + \text{O}_2$ (部分)<br>(烷氧基) |
| 40  | 下端左边结构      | ·放倒了                                                                                     | 取出来                                                                                                   |
| 49  | 倒 2、字 5     | 取出起                                                                                      | 脂酰基                                                                                                   |
| 58  | 表下第 4 行     | 酰脂基                                                                                      | 氨基酸                                                                                                   |
| 64  | 5           | 氮氨酸                                                                                      | $-\text{CH}_2-$                                                                                       |
| 69  | 二碘酪氨酸结构     | $-\text{OH}_2-$                                                                          | 去掉                                                                                                    |
| 76  | 图3-4        | $-\text{COOH}$ 未变化                                                                       | Arg                                                                                                   |
| 87  | 4           | Ary                                                                                      | $\alpha$ -羧基                                                                                          |
| 106 | 倒 8         | $\alpha$ -羧基                                                                             | $-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}-\text{COO}-\text{Z}$                                                  |
| 107 | 倒 8         | $-\text{CO}-\text{NH}-\text{COO}-\text{Z}$                                               | $-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}-\text{COO}-\text{Z}$                                                  |
| 108 | 图3-23       | $\text{R}_2$                                                                             | $\text{R}_2$                                                                                          |
| 118 | 1           | HCl-HAC                                                                                  | HCl-HAc                                                                                               |
| 129 | 倒 14        | 非共价键                                                                                     | 非共价键                                                                                                  |
| 135 | 6           | 容易                                                                                       | 容易                                                                                                    |
| 144 | 2           | 拌                                                                                        | 伴                                                                                                     |
| 156 | 1-甲基腺嘌呤结构   | equilibrium                                                                              | equilibrium                                                                                           |
| 157 | 1           | $-\text{NH}_3$                                                                           | $-\text{NH}_2$                                                                                        |
| 158 | 1           | 酵母                                                                                       | 酵母                                                                                                    |
|     |             | 戊糖组是                                                                                     | 戊糖组分是                                                                                                 |

| 页 数 | 行 数          | 误                                                                                   | 正                                                                                    |
|-----|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 163 | 第二排结构左边      |                                                                                     | 去掉                                                                                   |
| 175 | 正文 1         | 线生                                                                                  | 发生                                                                                   |
| 190 | 图4-22        | 外显大小                                                                                | 外显子大小                                                                                |
| 197 | 倒 3          | 称取环                                                                                 | 称作环                                                                                  |
| 202 | 注            | 一个基团                                                                                | 一个基因                                                                                 |
| 207 | 3            | 单核苷酸                                                                                | 单核苷酸                                                                                 |
| 219 | 图4-52        | 5'-脱氧核糖酸                                                                            | 5'-脱氧核苷酸                                                                             |
| 219 | 图4-53        | 3'-核核酸                                                                              | 3'-核苷酸                                                                               |
| 219 | 图4-52下的第 5 行 | 核长                                                                                  | 链长                                                                                   |
| 227 | 最下面右侧反应      |    |    |
| 228 | 反应式中         |    |    |
| 236 | 倒 3          | 糖白                                                                                  | 糖蛋白                                                                                  |
| 239 | 反应式下第 2 行    | $C_9$ 和 $C_{10}$ 有键相连                                                               | 应无键                                                                                  |
| 240 | 最上面右边的结构     | 1,25-二羟化 $D_3$                                                                      | 1,25-二羟化 $D_3$                                                                       |
| 240 | 倒 7          |                                                                                     |                                                                                      |
| 241 | 反应式右边的箭头     |                                                                                     |                                                                                      |
| 245 | 7            | 钠盐                                                                                  | 钠盐                                                                                   |
| 250 | 第 4 排反应式     | $\Delta^{11}$                                                                       | $\Delta^{11}$ 反                                                                      |
| 257 | 7, 第 4 字     | 因                                                                                   | 团                                                                                    |
| 268 | 文字第 2 行      | 乒乓                                                                                  | 乒乓                                                                                   |
| 268 | 倒数13行上面      | EP                                                                                  | FP                                                                                   |
| 281 | 最下面的两个名称     | 羧甲基                                                                                 | 羧甲基                                                                                  |
| 287 | 图6-34中       | Tyr249, Tyr245                                                                      | Tyr248                                                                               |
| 289 | 3, 第17字      | 例                                                                                   | 列                                                                                    |
| 298 | 9, 第 9 字     | 不是                                                                                  | 又是                                                                                   |
| 298 | 图6-45        | 放倒了                                                                                 |                                                                                      |
| 304 | 1            | 景                                                                                   | 暴                                                                                    |
| 331 | 图7-21        | 肾上腺皮质                                                                               | 肾上腺皮质                                                                                |
| 333 | 孕酮结构         |  |  |
| 344 | 11           | 3138                                                                                | -3138                                                                                |
|     | 倒11          | 1.65mol/L                                                                           | 1.65m mol/L                                                                          |
|     | 倒 7          | $\frac{[0.5 \times 10^4][165 \times 10^3]}{[2.25 \times 10^3]}$                     | $\frac{[0.25 \times 10^{-4}][1.65 \times 10^{-3}]}{[2.25 \times 10^{-3}]}$           |
| 346 | 倒15          | -4740<br>1363                                                                       | -4740<br>-1363                                                                       |
|     | 倒12}         | 已糖激酶                                                                                | 已糖激酶                                                                                 |
|     | 倒10}         |                                                                                     |                                                                                      |



| 页 数 | 行 数           | 误                                                                                   | 正                                                                                    |
|-----|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 346 | 倒 7           | 为因                                                                                  | 因为                                                                                   |
| 355 | 倒 3           | 无电荷的                                                                                | 极性                                                                                   |
| 375 | 倒 4 行上面右边     |                                                                                     | + NADH + H <sup>+</sup>                                                              |
| 365 | 4 (括号中)       | 解等                                                                                  | 解除                                                                                   |
| 382 | 文字倒 1 行       | 2-磷酸                                                                                | 3-磷酸                                                                                 |
| 383 | 倒数13          | 序。                                                                                  | 酶。                                                                                   |
| 384 | 20            | 肾上腺素                                                                                | 肾上腺素                                                                                 |
| 390 | 17            | 也接多种                                                                                | 也受多种                                                                                 |
| 391 | 倒 4 行上面       | 咪唑酸檬                                                                                | 异柠檬酸                                                                                 |
| 400 | 倒19           | 苹果脱氢酶                                                                               | 苹果酸脱氢酶                                                                               |
| 407 | 7             | 生为                                                                                  | 作为                                                                                   |
| 411 | 倒 1           | 然而                                                                                  | 然后                                                                                   |
| 412 | 10            | 少才多                                                                                 | 少得多                                                                                  |
| 414 | 图9-18         | 丙酮酸等                                                                                | 丙氨酸等                                                                                 |
| 418 | 倒 7 反应式左侧     | NADP <sup>+</sup>                                                                   | NADPH                                                                                |
| 421 | 倒4(center). 后 | 漏掉了                                                                                 | 在光合系统 I 中, 这个特殊的<br>叶绿素分子是 P <sub>700</sub> ,                                        |
| 422 | 倒13           | 叶紫素 b                                                                               | 叶绿素 b                                                                                |
|     | 倒 8           | 原还                                                                                  | 还原                                                                                   |
| 437 | 5             | 分子                                                                                  | 分子                                                                                   |
| 438 | 7, 8          | 键                                                                                   | 键                                                                                    |
| 441 | 图10 5第二排最左边   |    |    |
|     | 各式右边          |   |   |
| 444 | 3             | $\beta$ 羟乙酸                                                                         | $\beta$ -羟丁酸                                                                         |
| 458 | 4             | 如 P457式页                                                                            | 如 P457页                                                                              |
| 459 | 4, 5, 9       | 磷酸胆碱                                                                                | 磷脂酰胆碱                                                                                |
| 469 | 图             | 放反了                                                                                 |                                                                                      |
| 471 | 半乳糖脑苷脂结构中     | Gla                                                                                 | Gal                                                                                  |
| 473 | 最上面的反应式右侧     | IPP                                                                                 | 去掉                                                                                   |
|     | 第二排反应右侧结构下面   |                                                                                     | 加上 IPP                                                                               |
| 473 | DPP 结构式       | $-\text{CH}_2-$                                                                     | $-\text{CH}_2-\text{O}-$                                                             |
| 490 | 反应式分枝酸结构      |  |  |
| 491 | 文字第 6 行       | 加氮用作                                                                                | 加氮作用                                                                                 |
| 495 | 2             | 利的                                                                                  | 利用                                                                                   |
| 497 | 最下面的反应式箭头上    | -2,6-二羧酸                                                                            | -2,6-二羧酸脱氢酶                                                                          |
| 498 | 倒 1           | 表面异构酶                                                                               | 表异构酶                                                                                 |
| 505 | 文字第 2 行       | $\alpha$ -酮戊乙酸                                                                      | $\alpha$ -酮戊二酸                                                                       |



S0014712

页 数

行 数

误

正

506

文字第13行

- AMP

- ATP

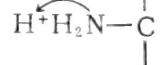
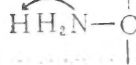
512

第一排反应右侧

$\oplus$

应作为加号“+”

第二排反应右侧



539

例 2

如下式

如上式

542

反应式下第 4 行

氨甲酰

氨甲酰

550

反应中间

NAD<sup>+</sup>

ATP

ATP

565

例 6

带长

带长单

567

例 7

上式

图 13 9

575

例 9

扑异构酶 I

扑异构酶 I

576

18

DCP

DBP

576

例 4

装隙

裂隙

579

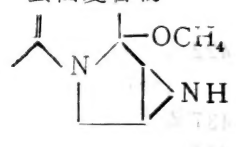
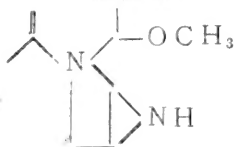
2

蛋白物

蛋白复合物

583

上端的结构式



588

守恒 T 箭头指向

TATGTTG

TATGTTG

591

例 4

N-形因

N-基因

592

例 12

核但

但核

606

表 14-1 末行第 1 箭头

608

图

图 41-I

图 14-1

608

例 9, 第 3 个密码

UAG

UGA

610

8

简并性

简并性

622

19

fRNA

tRNA

622

反应式第一行

- tRNA

- tRNA

623

15

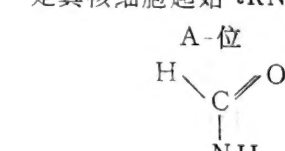
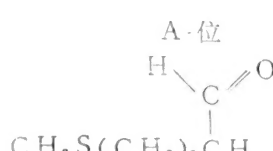
起始 tRNA 存在

起始 tRNA 间另一不同之点

是真核细胞起始 tRNA 存在

628

反应式右边结构



628

例 5

tPNA

tRNA

630

例 6

613 页

631 页

644

1

图中 Trp R 为

图中 P·O·之前有一 Trp R 为

664

8

第一节构

第一节

666

图 16-3

放倒了

669

例 3

细菌体

噬菌体

670

1

溶菌生长

溶菌生长

4

|         |
|---------|
| 90.6.6. |
| 西单书     |
| 价 7.50  |
| 163176  |
| 90.6.5  |

58.173

25371

225

生物化学

| 借者    | 还期       | 借者    | 还期       |
|-------|----------|-------|----------|
| 39440 | 90.7.11  | 12037 | 90.12.11 |
| 80    | 90.10.23 | 13    |          |
|       | 8日       |       |          |

58.173  
225

### 注 意

- 1 借书到期请即送还。
- 2 请勿在书上批改圈点，折角。
- 3 借去图书如有污损遗失等情形须照章赔偿。

25371

责任编辑 黄汉平  
封面设计 古月

ISBN 7-907-00618-9/Q-18

定价: 7.50元